

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
Институт биоорганической химии
им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова



ПРОБЛЕМА БЕЛКА

В ПЯТИ ТОМАХ

Том 1. ХИМИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ БЕЛКА

Том 2. ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ БЕЛКА

Том 3 СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БЕЛКА

Том 4. СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ БЕЛКА

Том 5 СТРУКТУРА, ФУНКЦИЯ
И ЭВОЛЮЦИЯ БЕЛКА

Ответственный редактор
академик В Т ИВАНОВ



МОСКВА «НАУКА» 1997

ПРОБЛЕМА БЕЛКА

Том
3

Е. М. Попов

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БЕЛКА

Редактор тома
кандидат химических наук
Т И СОРКИНА



МОСКВА «НАУКА» 1997

УДК 577.112.5
ББК 24. 239
П 78

Рецензенты

член-корреспондент РАН А И МИРОШНИКОВ,
доктор физико-математических наук В Г ТУМАНЯН

Проблема белка. Том 3: Структурная организация белка /
Е.М. Попов. – М.: Наука, 1997. – 604 с. Ил.
ISBN 5-02-001911-9, т. 3

Монография посвящена рассмотрению существующих подходов к изучению принципов молекулярной структурной организации и механизма свертывания белка в нативную конформацию. Книга состоит из введения и четырех частей. В первой части изложена бифуркационная теория самосборки полипептидной цепи, физическая конформационная теория и метод априорного расчета пространственного строения белка по известной аминокислотной последовательности. В других частях рассмотрены конформационные возможности простейших пептидов, сложных олигопептидов и белков. Представлены результаты количественного анализа конформационных состояний большого числа пептидов и низкомолекулярных белков. Изложен подход автора к решению обратной структурной задачи, позволяющей целенаправленно конструировать наборы искусственных аналогов, пространственное строение которых выборочно отвечает низкоэнергетическим, потенциально биологически активным конформациям природного пептида.

Для специалистов, работающих в области биологии, физики, химии и медицины

Protein problem. Vol. 3: Structural organization of the protein /
E.M. Popov – M.: Nauka, 1997. – 604 p. Il.
ISBN 5-02-001911-9, vol. 3

This monograph reviews the principles of the protein molecular structural organization and the mechanism of its folding into the native conformation. The volume consists of an introduction and four parts. The first part embraces the bifurcation theory of self-assembly of the polypeptide chain, the physical conformation theory as well as the method for a priori prediction of the protein spatial structure starting from the known amino acid sequence. The other parts analyze conformational possibilities of simplest model peptides, more complex oligopeptides and proteins. Besides, the description of conformational states of a large number of peptides and low molecular proteins these parts provide evidence for efficacy and validity of the author's theoretical and methodological studies.

The book is of interest to professionals in chemistry, physics, biology and medicine

ТП-96-II-№ 134
ISBN 5-02-001691-8,
ISBN 5-02-001911-9, т. 3

© Е.М. Попов, 1997
© Издательство "Наука",
художественное оформление, 1997
© Российская академия наук, 1997

ПРЕДИСЛОВИЕ

Настоящий том, третий из намеченных монографий по проблеме белка, посвящен вопросам взаимосвязи между аминокислотной последовательностью, с одной стороны, и пространственным строением, динамическими конформационными свойствами и механизмом процесса свертывания беспорядочно флуктуирующей белковой цепи в нативную конформацию, с другой, т.е. – теоретическим аспектам структурной самоорганизации белка. Он является продолжением первых двух томов издания^{1, 2}, в которых были рассмотрены экспериментальные и концептуальные исследования химического и пространственного строения белковых молекул с момента возникновения работ в этих областях и по сегодняшний день. Автор подробно анализирует существующие представления о природе взаимоотношений между первичной и пространственной структурой белков, уделяя, естественно, особое внимание развиваемой им теории.

Книга во многом полемична. Так, в главе 18 рассматривается концепция Л.Б. Меклера о стереохимическом генетическом коде. Несмотря на то что прошло много лет с его первой публикации (а за ней были и другие), идеи Л.Б. Меклера, послужившие основанием для далеко идущих выводов, не получили прямого экспериментального развития. Излагая свой взгляд на причины такого положения, автор впервые дает критический анализ упомянутой концепции. В книге также ставятся под сомнение широко распространенные представления о роли водородных связей в формировании конформаций олиго- и полипептидов, отрицаются иерархичность структурной организации белков (от первичной структуры к вторичной, супервторичной, доменам и полной пространственной структуре) и целесообразность введения понятия "расплавленная глобула" для описания переходного состояния между нативным и денатурированным состоянием глобулярных белков. Несмотря на приводимую при этом весомую аргументацию, вряд ли перечисленные выводы будут легко приняты научной общественностью. Ответственный редактор надеется, что высказанные в томе положения будут замечены коллегами и вызовут дискуссию, которая пойдет на пользу науке.

Однако, несомненно, что в целом книга представит большой интерес для специалистов, работающих в области химии, биологии и медицины.

В.Т. Иванов

¹ Попов Е.М., Решетов П.Д., Липкин В.М. и др. Проблема белка Т 1 Химическое строение белка. М. Наука, 1995.

² Попов Е.М., Демин В.В., Шибанова Е.Д. Проблема белка Т 2 Пространственное строение белка. М. Наука, 1996

Существующие представления о принципах структурной организации белка и путях многостадийного процесса самосборки полипептидной цепи можно отнести к трем альтернативным точкам зрения. Каждой из них отвечает свой специфический набор экспериментальных и теоретических методов, свой особый подход к изучению этого уникального природного явления и своя возможность в достижении конечной цели – количественного описания механизма сборки и расчета координат атомов нативной трехмерной структуры и динамических конформационных свойств белковой молекулы по известной аминокислотной последовательности. Обсуждению современного состояния и перспектив развития трех направлений исследований структурной самоорганизации белка, условно названных эмпирическим, теоретическим (*ab initio*) и генетическим, уделено в этой книге основное внимание.

Эмпирическое направление, рассмотрение которого было начато во втором томе настоящего издания, базируется на данных статистического анализа известных кристаллических структур белков, равновесной термодинамики, формальной кинетики и концепциях Полинга–Кори и Козмана, т.е. исходит из предположения об исключительной роли в сборке гетерогенной аминокислотной последовательности регулярных вторичных структур и представления о гидрофобных взаимодействиях как главной упаковочной силе. Считается, что по сравнению с множеством мыслимых нерегулярных локальных структур вторичные структуры являются самыми стабильными; их возникновение, инициирующее процесс и обуславливающее дальнейшее его развитие, осуществляется с наибольшей скоростью. Благодаря гидрофобным взаимодействиям вторичные структуры образуют супервторичные, т.е. полярные остатки стремятся расположиться на внешней оболочке глобулы, а неполярные – в ее интерьере. Идеальная модель трехмерной структуры белка, согласно эмпирическому подходу, должна представлять собой ансамбль вторичных и супервторичных структур и иметь гидрофобное ядро, экранированное от водной среды гидрофильной оболочкой. Процесс создания такой модели из статистического клубка должен быть равновесным фазовым переходом первого рода, подчиняющимся классической термодинамике, статистической физике и формальной кинетике так же, как им подчиняются процессы кристаллизации малых молекул и образования линейных спиральных сегментов гомотополипептидов.

Фундаментом второго, теоретического, направления исследований механизма свертывания белковой цепи, рассмотрению которого посвящена большая часть книги, служит нелинейная неравновесная термодинамика. Она впервые позволила объяснить причины спонтанного возникновения высокоорганизованных структур наличием у неравновесных, диссипатив-

ных систем особых незатухающих, т.е. необратимых (бифуркационных), флуктуаций. Последние могут проявляться только в определенных условиях вследствие специфических молекулярных свойств микроскопических составляющих, которые, по определению, не учитываются классической термодинамикой. Последовательная цепочка таких взаимосвязанных и согласованных друг с другом и благодаря этому неравновесных и эволюционирующих в определенном направлении флуктуаций – непосредственная причина зарождения и развития порядка из хаоса как в живых, так и в неживых физических и химических системах.

Теоретический подход к решению проблемы начался с разработки на основе нелинейной неравновесной термодинамики феноменологической бифуркационной теории самопроизвольного свертывания белковой цепи. По этой теории, важнейшая особенность белков, обуславливающая неизбежность появления необратимых, бифуркационных, флуктуаций и, следовательно, возникновения из хаоса высокоорганизованной структуры, заключается в специфической конформационной неоднородности природной аминокислотной последовательности. Это положение теории отражает суть рассматриваемого явления и постулирует наличие неразрывной связи между химическим строением белковой цепи, ее конформационными свойствами и необратимыми флуктуациями. Гетерогенность природной аминокислотной последовательности ответственна за различие в конформационных возможностях отдельных участков. Конформационная гетерогенность чередующихся жестких и лабильных белковых фрагментов порождает термодинамическую неоднородность флуктуаций, дифференцируя их на обратимые и необратимые.

Бифуркационная теория сборки впервые смогла дать принципиальную и непротиворечивую трактовку важнейшим особенностям структурной самоорганизации белка: самопроизвольному характеру возникновения и протекания всех стадий образования трехмерной структуры, большой скорости и безошибочности процесса при беспорядочно-поисковом механизме сборки. Теория указала направление и содержание дальнейшего изучения проблемы, которые привели к разработке физической конформационной теории и созданию априорного метода расчета. Теоретическое и практическое значение имело то обстоятельство, что бифуркационная модель сборки впервые позволила представить свертывание белковой цепи как спонтанно протекающий и строго детерминированный процесс, не требующий обязательного перебора всех возможных конформационных состояний и в то же время не ставящий под сомнение беспорядочность и случайность возникновения флуктуаций. Вызванная неравновесностью процесса авто-селекция флуктуаций выявила призрачность проблемы множественности локальных минимумов на потенциальной поверхности белка. Она оказалась псевдопроблемой, возникающей исключительно благодаря привлечению к описанию процесса аппарата равновесной термодинамики и статистической физики.

В физической теории нативная конформация белка представляет собой плотно упакованную структуру. При ее формировании внутримолекулярные взаимодействия валентно-несвязанных атомов оказываются преобладающими над межмолекулярными. Далее предполагается, что в нативной

конформации белка имеет место согласованность между всеми внутримолекулярными невалентными взаимодействиями атомов. Созданная на основе бифуркационной теории и обобщения ряда физических свойств белковых молекул физическая теория, в свою очередь, стала исходной для разработки специального метода расчета трехмерной структуры белка по известной аминокислотной последовательности.

Решающую роль в создании количественного метода сыграли положения о гармонии всех внутриостаточных и межостаточных взаимодействий и их преобладающем энергетическом влиянии над взаимодействиями белковой цепи с молекулами и ионами и окружающей среды. Одно из этих положений позволило разделить проблему структурной организации белка на три менее громоздкие и поддающиеся последовательному решению частные проблемы: ближних, средних и дальних взаимодействий. В результате специально разработанной классификации пептидных структур на конформации, формы и шейпы стало возможным получение достоверных количественных данных о конформационных состояниях целых наборов структурных вариантов различных таксономических групп, ограничившись детальным анализом их отдельных представителей. Классификация настолько сократила объем вычислительных работ, что сделала реальным расчет трехмерных структур белков, на первых порах низкомолекулярных. Изложенные в книге результаты априорных расчетов структур трипсинового ингибитора, сложного фрагмента нейротоксина II и большого числа олигопептидов, состоящих из десятков аминокислотных остатков, свидетельствуют об адекватном отражении предложенными теориями (бифуркационной и физической) структурной самоорганизации белков и пептидов и реальности предсказания их нативных конформаций.

В рамках теоретического направления рассмотрен подход к решению обратной структурной задачи пептидов и белков, позволяющий целенаправленно конструировать наборы искусственных аналогов природных аминокислотных последовательностей по заранее заданным пространственным формам.

Третье направление исследований механизма свертывания белковой цепи в нативную конформацию строится на предположении о наличии особого стереохимического кода (второго генетического кода).

Автор выражает глубокое чувство признательности В.В. Егоровой, Н.Н. Шумаковой, Т.И. Яковлевой, Л.И. Петровой и И.М. Приваловой за неоценимую помощь в подготовке рукописи к печати.

Введение

БИОСФЕРА, НАУЧНОЕ МЫШЛЕНИЕ И ПРОБЛЕМА БЕЛКА

Сегодня, в самом конце XX в., уместен вопрос о том, какие в уходящем столетии произошли события фундаментальной важности в физике, химии и биологии, которые не только оказали глубочайшее воздействие на естественнонаучную и техническую сферы деятельности человека, но и кардинальным образом затронули его духовный мир, культуру, восприятие природы и самого себя. Каким в конечном счете, если иметь в виду все естествознание, назовут наш век потомки? Полагаю, они назовут его веком становления квантовой механики, молекулярной биологии и физики открытых систем.

Появление квантовой механики (1920–1930-е годы) проявилось в создании теории строения атомов, квантовой теории валентности, теории строения молекул и квантовохимических методов расчета. Огромное значение имела разработка квантовой теории дисперсионных взаимодействий атомов и молекул. Квантовая механика объединила науку о микромире с классической физикой, установила, обосновав периодическую систему элементов Д.И. Менделеева, неразрывность физики и химии и стала единой основой изучения физических и химических явлений.

Рождение молекулярной биологии (1940–1960-е годы) означало определение химического и пространственного строения белков, нуклеиновых кислот и молекул других соединений живой материи, а также установление универсальности генетического кода и молекулярного механизма наследственности и изменчивости, общности биохимических принципов метаболизма и морфологического построения всего живого и многое другое. В результате органический мир предстал не как хаотическая и устрашающая своим многообразием совокупность видов и форм, а как иерархически упорядоченная система, имеющая единую молекулярную структурную организацию.

Вплоть до середины XX в. развитие биологии происходило путем ступенчатой редукции – последовательного перехода от изучения более сложных биосистем к изучению менее сложных, в соответствии с субординационной структурной организацией живой природы. В своем движении от высшего к низшему, от функции к структуре биология, наконец, подошла к исследованию простейшего уровня биологических систем – их молекулярного "дна". С появлением молекулярной биологии и ее составной части – молекулярной генетики, наука обрела качественно новое представление о единстве, целостности и субординационной взаимосвязи

всего живого и универсальности процессов жизнедеятельности. Перед биологией открылся принципиально новый, холостический путь познания. Она впервые получила возможность развиваться в диаметрально противоположном направлении – от простого к сложному, от структуры к функции, от изучения организации элементарных биосистем вверх по ступенькам иерархии живого. Открылась перспектива становления биологии как точной науки, имеющей единый, объемлющий все ее направления, теоретический базис. Но это не все. Биология, приступив к физико-химическому исследованию атомно-молекулярных систем, соединилась на том же уровне с физико-химическим изучением явлений неорганического мира. Таким образом, у науки о живой природе появилась возможность строить исследования простейших биосистем на атомно-молекулярной основе, созданной ранее физикой и химией, а естествознание благодаря молекулярной биологии впервые обрело общую элементарную основу для познания сущности живой и неживой природы.

Перечень достижений естествознания XX в. фундаментальной важности был бы неполным без еще одного эпохального события, которое произошло совсем недавно – в конце 70–начале 80-х годов. Речь идет о возникновении нелинейной неравновесной термодинамики, или физики открытых систем. Ее становление обязано прежде всего И.Р. Пригожину, разработавшему теорию динамических состояний макроскопических систем особого типа – диссипативных самоорганизующихся структур – и теорию бифуркаций, дифференцирующую беспорядочные флуктуации на обратимые (равновесные) и необратимые (неравновесные). Они составили основу для изучения явлений, суть которых определяется неразрывной связью макроскопических свойств большого ансамбля с индивидуальными свойствами микроскопических составляющих. В открытых системах, находящихся вдали от положения равновесия, могут протекать процессы, приводящие к спонтанному возникновению порядка из хаоса. Источником самопроизвольного конструирования пространственного и пространственно-временного порядка на всех уровнях структурной организации системы является необратимость бифуркационных флуктуаций.

Нелинейная неравновесная термодинамика осуществила синтез вероятности и необходимости, кумулятивного развития и скачкообразных изменений, физической концепции развития Клаузиуса и эволюционной теории Дарвина, равновесной термодинамики, изучающей макроскопическое проявление множества систем вне связи с конкретным механизмом, свойствами и строением микросоставляющих, и классической физики (как и квантовой механики), изучающей детали процессов, свойства и строение микро- и макросистем, состоящих из малого числа компонентов. Новая область знаний собрала воедино то, что было разъято на составные части, и установила соотношения между тем, что противопоставлялось друг другу, казалось взаимоисключающим или отрицалось как иллюзия или результат неполного знания. Представление о мире исключительно как о стационарной системе, в которой необходимость порождает только необходимость, оказалось несостоятельным и было опрокинуто многочисленными фактами из всех областей естествознания. Мир явился качественно многообразным, темпоральным, полным случайных и непредсказуемых

иррациональных событий. Возникла убежденность, что вероятность и необратимость представляют собой объективные реальности, имманентные свойства материи, обуславливающие эволюционные процессы усложнения и совершенствования структур и способность живой и неживой природы спонтанно конструировать порядок из хаоса.

Таким образом, благодаря становлению квантовой механики, молекулярной биологии и нелинейной неравновесной термодинамики вступающее в XXI в. естествознание имеет единый элементарный фундамент и представляет собой обобщенную науку о совершающихся в природе деградации и созидании структур, обратимых и необратимых процессах, вероятностных и каузальных явлениях. Возросшие совокупные возможности физики, химии и биологии, происшедшие глубинные синтезы понятий о времени и динамике, случайности и необходимости, порядке и хаосе означали вступление науки о живой и неживой природе в новую фазу своего развития – фазу обобщенного естествознания. Оно все чаще начинает выступать как цельная наука, как натурфилософия наших дней, изучающая органический мир, неорганический мир и взаимоотношения между ними с общей естественнонаучной позиции.

Во все времена предпринимались попытки понять, что такое жизнь, почему существует живая и неживая природа, в чем причина особенностей растительных и животных организмов и неорганических тел, чем обусловлены постоянная изменчивость и эволюционное развитие органического мира на фоне кажущегося неизменным или даже деградирующим неорганического мира, есть ли между ними что-либо общее и, наконец, подчиняются ли оба мира единым законам. Вплоть до наших дней эти и многие другие вопросы, затрагивающие структурную организацию биосферы, а также научное мышление и различные аспекты проблемы белка, могли рассматриваться лишь на философском уровне или, в лучшем случае, на чисто эмпирической основе. Истинно научная постановка многих проблем стала возможной только сейчас, после возникновения обобщенного естествознания. Некоторые из перечисленных выше вопросов общего характера обсуждаются во введении, которое следует рассматривать идейным вступлением к изложению основного материала, посвященного теории и методу расчета молекулярной структурной организации природных аминокислотных последовательностей – центральной задаче проблемы белка.

Биосфера и научное мышление. Поверхностный слой нашей планеты и примыкающий к нему слой тропосферы, с которыми связана жизнь, образуют особое биологическое пространство, названное еще Ж.Б. Ламарком "областью жизни", или "биосферой". Появившись первоначально в водной стихии, биосфера со временем распространилась на весь материковый слой и атмосферную оболочку, образовав саморазвивающуюся систему открытого типа, обменивающуюся с космосом веществом и энергией. К моменту появления в четвертичном периоде вида "*Homo sapiens*" биосфера обладала внеземной структурной организацией. Об этом событии П. Тейяр де Шарден писал: "Человек в том виде, каким его удастся воспроизвести сегодняшней науке, – животное, подобное другим. По своей анатомии он так мало отличается от человекообразных обезьян, что современные классификации зоологии, возвращаясь к позициям Лин-

нея, помещают его вместе с ними в одно и то же семейство гоминиоидных. Но если судить по биологическим результатам его появления, то не представляет ли он собой как раз нечто совершенно иное? Ничтожный морфологический скачок и вместе с тем невероятное потрясение сфер жизни – в этом весь парадокс человека" [1. С. 135].

Исключительность вида "*Homo sapiens*" и присущие только ему особенности проявления в биосфере связаны со способностями человека мыслить, приобретать знания, вести духовную жизнь. По-видимому, первый, кто еще на заре Нового времени (конец XVI – начало XVII в.) обратил внимание на мощь человеческого разума, был Ф. Бэкон, один из основоположников теоретических основ современной науки. Им была выдвинута идея завоевания человеком власти над природой и провозглашен тезис "знание – сила". В конце XVIII в. Ж. Бюффон связал становление новой геологической эры с разумом человека.

Научное мышление вместе с другими видами мышления – философским, религиозным, эстетическим, этическим, социальным и политическим – составляют духовную жизнь отдельного человека, общества и человечества в целом. Склонность к научному поиску истины проявилась у людей сравнительно недавно – около трех тысяч лет назад. К этому времени уже существовали все перечисленные выше виды мышления, были созданы правовые и социальные структуры общества, достигнут высокий уровень интеллектуального развития. В некоторых областях философии, религии, права и искусства этот уровень так и остался непревзойденным. Первое самостоятельное научное мировоззрение начало формироваться лишь в конце XVII в., без малого на два тысячелетия позднее появления христианства с его идеями свободы и любви и Римского права, впервые сформулировавшего понятия о человеческой индивидуальности и общечеловеческих ценностях и провозгласившего незыблемость закона. Спонтанное возникновение научного мышления завершило создание сложного, склонного к самосовершенствованию комплекса имманентных психических функций мозга, определивших разностороннюю умственную деятельность человека. Все формы сознания в той или иной мере, а в наибольшей – религия и философия, участвовали в синтезе научного мышления. Его формирование означало становление еще одного уникального природного дара человека – способности к научному творчеству, поиску истины ради нее самой, генерации и аккумуляции объективных знаний о материальном мире.

Все виды естественнонаучного, гуманитарного и религиозного мышления самоценны и качественно отличаются друг от друга, хотя, если иметь в виду не индивидуальное, а общечеловеческое сознание, не существуют порознь. Теснейшим образом взаимодействуя между собой, они образуют целостную систему. Изменение одного вида мышления непременно сказывается на состоянии остальных. В.И. Вернадский справедливо отмечает: "Прекращение деятельности человека в области ли искусства, религии, философии или общественной жизни не может не отразиться болезненным, может быть, подавляющим образом на науке. В общем мы не знаем науки, а следовательно, и научного мировоззрения вне одновременного существования других сфер человеческой деятель-

ности; и поскольку мы можем судить из наблюдений над развитием и ростом науки, все эти стороны человеческой души необходимы для ее развития, являются той питательной средой, откуда она черпает жизненные силы, той атмосферой, в которой идет научная деятельность" [2. С. 58]. Опасно не только прекращение деятельности человека в той или иной сфере духовной жизни, но, очевидно, не менее опасно противопоставление различных видов мышления и введение иерархии – завоевания одним из них господствующего положения и лишения возможности свободного развития других. История всех времен дает тому массу примеров.

Неразрывная связь между многочисленными видами мышления без насильственного нарушения их автономии составляет главную особенность рефлексизирующего сознания человека. Сущность человеческого духа заключена в триединстве чувства, разума и веры, т.е. в сочетании трех качеств, никогда не расторгаемых, но и никогда полностью не поглощаемых их единством. Специфика каждого вида мышления, подобно дополнительным цветам радужного спектра, определяется не его особой природой, отличной от природы других видов, а соотношением в духовном единстве трех указанных составляющих. В искусстве превалирует эмоциональное переживание, чувство, в науке – разум, объективные знания и факты, в религии – вера, надежда или убежденность в существовании Бога и трансцендентного мира. Следует подчеркнуть, что основная составляющая только превалирует в соответствующем виде мышления, но никак не определяет его содержания целиком; роль минорных составляющих весьма велика и ни в одном случае не может быть проигнорирована. Нет науки без веры, как веры без знаний. И тут и там непременно присутствуют эмоции, точно так же, как в искусстве наряду с чувством должны присутствовать вера и разум. "Если допустить, что жизнь человеческая может управляться разумом, – писал Л.Н. Толстой, – то уничтожится возможность жизни" [3. С. 628]. Поэтому высокообразованный и гармонично развитый человек должен в той или иной мере владеть тремя видами культуры: гуманитарной, религиозной и естественнонаучной.

Три составляющие человеческого духа – чувство, разум и вера – имеют массу разновидностей и оттенков, число комбинаций которых практически бесконечно. Поэтому так неповторима личность каждого человека, его индивидуальность, так различны отношения людей друг к другу и к одним и тем же событиям, так непохожи их мировосприятие и мировоззрение. "Каждый человек, – утверждает Н.А. Бердяев, – имеет свой особый внутренний мир. И для одного человека мир совсем иной, чем для другого..." [4. С. 43]. По-видимому, почти невозможно встретить духовных близнецов – людей, полностью независимых в своих суждениях и в то же время совершенно одинаково относящихся к достаточно широкому кругу проблем. Во всяком случае, их существование представляется менее вероятным, чем существование внешне идентичных близнецов.

Унификация умственной деятельности и ограничение индивидуальной свободы человека противоестественны и поэтому неизбежно ведут к

пагубным последствиям во всех сферах духовной жизни как отдельной личности, так и общества в целом. "Не влезешь силой в совесть никому, и никого не вгонишь в рай дубинкой", – писал Вл.С. Соловьев [5. С. 422]. А. Эйнштейн по этому же поводу заметил: "Большая ошибка думать, что чувство долга и принуждение могут способствовать находить радость в том, чтобы смотреть и искать. Мне кажется, что даже здоровое хищное животное потеряло бы жадность к еде, если бы удалось с помощью бича заставить его непрерывно есть, даже когда оно не голодно, и особенно, если принудительно предлагаемая еда не им выбрана" [6. С. 31].

Происхождение научного мышления. О причинах того, что послужило побудительным мотивом к пробуждению в человеке интереса к окружающему миру, раскрытию склонности его сознания к научному мышлению, накоплению систематических научных знаний и формированию самостоятельного научного мировоззрения, существуют самые различные предположения. Н.А. Бердяев, например, утверждает, что: "По специфической своей сущности наука есть реакция самосохранения человека, потерянного в темном лесу мировой жизни... Наука есть усовершенствованное орудие приспособления к данному миру, к навязанной необходимости... Наука по существу своему и по цели своей всегда познает мир в аспекте необходимости, и критерий необходимости – основная категория научного мышления как ориентирующего приспособления к данному состоянию бытия" [7. С. 266–267]. "В науке, – говорит далее Н.А. Бердяев, – есть горькая нужда человека" [7. С. 269].

Сходной позиции придерживается П.Л. Капица, который полагает, что возникновение науки есть прямой результат практической деятельности человека, впервые начавшего строить свое благосостояние путем преобразования природы, а не только путем приспособления к ней, подобно остальному животному миру. Рождение научного мышления, по мнению Капицы, произошло в то время, когда человек, подчиняясь как часть природы закону естественного отбора и используя лежащий в его основе эволюционный метод "проб и ошибок", научился "...не повторять ошибок и теоретически обобщать опыт найденных эмпирически полезных проб" [8. С. 61] и таким образом сделал этот метод более эффективным. Сущность механизма трансформации утилитарной деятельности в научное творчество, считает Капица, состоит в том, что «при использовании метода "проб и ошибок" приобретенный опыт становится научным, когда он обобщается на основе закона причинности: определенные причины всегда вызывают определенные следствия...» [8. С. 71].

По существу ту же точку зрения на происхождение науки имеет А.Д. Александров. Так, он утверждает: "Наука зарождалась вместе с развитием земледелия и государственности в тех центрах, где это происходило: в Египте, Вавилоне, Китае, Индии. Практические задачи усложнялись и требовали более систематических и более сильных средств их решения. Если примитивному охотнику достаточно было считать, скажем, до десяти, то чтобы сосчитать войско или собирать дань и подать, нужно было доходить до тысячи и дальше... Началом науки можно считать достаточно систематическую и достоверную сводку фактов и приемов решения каких-либо задач" [9. С. 306].

Доводы Капицы и Александрова, как и Бердяева, в пользу исключительно опытного, утилитарного происхождения науки, по моему мнению, не являются вполне убедительными, а тем более исчерпывающими. Они выглядят скорее простой констатацией факта возникновения науки и полезности научных знаний, чем доказательным объяснением причины появления научного мышления. Методом "проб и ошибок" в какой-то мере владеют и животные. Умение же человека считать до десяти или даже до тысячи не есть проявление научного мышления. Становление науки произошло значительно позднее появления земледелия, скотоводства и даже государственного устройства. Дани и подати собирали уже в течение тысячелетий, а науки все еще не было. Научное мышление возникло после того, как сложились определенные эстетические, религиозные и философские воззрения, были разработаны некоторые разделы математики, заложены основы логики. Связь, если она и есть, между высшей формой духовной жизни человека и его утилитарными побуждениями во всяком случае не столь прямолинейна и наглядна, как это следует из исторического материализма, предусматривающего безусловный приоритет материальных условий жизни общества над духовными, зависимость так называемых надстроечных явлений от базисных. Во все времена такая связь, как правило, отсутствовала в деятельности выдающихся естествоиспытателей.

Известно, например, что открытие дифракции, интерференции, поляризации и дисперсии света и изучение этих явлений в XVII–XVIII вв. не имели никакого отношения к производству и преследовали лишь чисто научные, познавательные цели. Далеко не сразу и не самими авторами было оценено в XVIII–XIX вв. практическое значение знаменитых открытий и теоретических обобщений в области электричества. Отнюдь не повседневной практикой и не материальными стимулами были вызваны оказавшиеся epochальными для всего естествознания исследования Б. Франклина, Л. Гальвани, Х. Эрстеда, М. Фарадея, Дж. Максвелла. А Г. Герц, экспериментально доказавший существование электромагнитных волн, и не подозревал о возможности их практического применения. Обнаруженная А.А. Беккерелем на пороге XX в. радиоактивность, приведшая в конечном счете к рождению новой цивилизации, вначале была воспринята как любопытное малозначащее природное явление.

К.А. Тимирязев, признавая в принципе существенную роль утилитарных стимулов в деятельности человека, не считал, однако, их определяющими в становлении научного мышления и выборе направления его развития. Анализируя развитие биологии в XIX в., он писал: "Последовательные задачи биологии вытекали из логического сцепления самих явлений, без всякого отношения их к пользе или вреду человека, а в результате явились бесчисленные и самые неожиданные приложения" [10. С. 289]. Появление зачатков научных знаний Тимирязев связывал не с материальной пользой, а с тем, что "...стремление человека, начиная с самого первобытного его существования, под влиянием самых первобытных религий (или под властью магии – Фостер), выражалось в стремлении овладеть двумя драгоценными дарами – даром чудодействия и даром пророчества – эти два дара принесла ему наука" [11. С. 13]. То, что

"человек оставаться без чуда не в силах", отмечал также Ф.М. Достоевский. "Ибо тайна бытия человеческого, – писал он в своем последнем романе, – не в том, чтобы только жить, а в том, для чего жить. Без твердого представления себе, для чего ему жить, человек не согласится жить и скорее истребит себя, чем останется на земле, хотя бы кругом его все были хлеба" [12. С. 316].

Материальными условиями, конечно, определяется сама жизнь человека, и в этом смысле, а не в утилитарном, можно утверждать, что в вещественном мире "бытие определяет сознание". Однако данный расхожий тезис материализма не имеет прямого отношения к научному мышлению. История науки свидетельствует, что среди мотивов, побуждающих к научному творчеству, отсутствовало стремление к материальной выгоде. С момента своего возникновения и вплоть до XVIII в., т.е. в течение более двух тысяч лет, наука не оказывала заметного влияния на ремесла, кустарное производство и даже изобретательство. Вспомним техническое творчество Герона Александрийского, жившего в I веке н.э. Технический уровень в эти тысячелетия определялся не научным мышлением, а традициями, опытом и так называемым здравым смыслом. Утилитарным происхождением науки трудно объяснить тот факт, почему научный поиск, зародившийся в странах Востока и Древней Греции, не получил практически никакого развития ни в Древнем Риме, ни в средневековой Европе, т.е. был приостановлен почти на 1,5 тыс. лет. На протяжении более чем тысячелетней истории России наука эффективно развивалась лишь в последние полтора столетия, если не считать два десятилетия деятельности М.В. Ломоносова.

Научным изысканиям вплоть до XX в. посвящали свое время только склонные к такого рода занятиям отдельные личности. Как правило, они принадлежали к обеспеченным слоям общества, отличались свободомыслием и в значительной мере были независимы от утилитарного гнета. "Наука, – отмечал Тейяр де Шарден, – возникла под внешней видимостью излишества, фантазии. Избыток внутренней активности над материальными потребностями жизни. Любопытство мечтателей и праздных. Мало-помалу значение и действенность науки дали ей право гражданства. Живя в мире, о котором справедливо можно сказать, что он революционизирован наукой, мы согласились с общественной ролью, даже с культом науки" [1. С. 219].

И. Гёте, которому почти в равной мере были доступны мир науки, мир философии и мир поэзии, полагал, что подлинный ученый кончается, как только теряет способность изумляться вечным закономерностям природы. Он писал:

"Я не ищу покоя столбняка,
Способность потрясаться – высока,
И непривычность чувства драгоценна
Тем, что роднит с безмерностью
Вселенной".

"Изумление, – цитирует Гёте Сократа, – есть мать всего прекрасного" [13. С. 236].

Р. Декарт, обсуждая страсти человеческой души, на первое место ставил удивление как первострасть. "Удивление, – говорил он, – есть внезапная неожиданность для души, понуждающая последнюю обсуждать внимательно предметы, которые кажутся ей редкими и выдающимися. Оно прежде всего подчиняется данным в мозгу впечатлению, которое представляет предмет как редкий и стало быть достойный рассмотрения" [14. С. 507].

Материальная сторона жизни, считал А. Эйнштейн, не может полностью удовлетворить человека, как мыслящего и чувствующего существа, и побудить его к научному творчеству. Вот что писал он по этому поводу в автобиографии: "Там, во вне, был этот большой мир, существующий независимо от нас, людей, и стоящий перед нами как огромная вечная загадка, доступная, однако, по крайней мере отчасти, нашему восприятию и нашему разуму. Изучение этого мира манило как освобождение, и я скоро убедился, что многие из тех, кого научился ценить и уважать, нашли свою внутреннюю свободу и уверенность, отдавшись целиком этому занятию. Мысленный охват, в рамках доступных нам возможностей, этого внеличного мира представлялся мне наполовину сознательно, наполовину бессознательно, как высшая цель" [6. С. 28]. Возникновение научного мышления в той же мере можно объяснить материальными утилитарными причинами, в какой такое объяснение оказалось бы справедливым в отношении наскальных рисунков и скульптур древних художников и ваятелей, поэзии Гомера, религий язычества, буддизма и иудаизма, диалектики Гераклита, этики Сократа и Диогена, философии Демокрита и Платона, математики Пифагора и Архимеда, логики Аристотеля. А. Эйнштейн на вопрос о назначении научного творчества высказал следующее соображение: "Наука, как нечто существующее и завершенное, является чем-то наиболее объективным из известного человеку. Но в своей деятельности как цель, к которой мы стремимся, наука так же субъективна и психологически обусловлена, как и любая другая область человеческих устремлений, причем настолько субъективна, что на вопрос "какова цель и назначение науки?" в различные времена и от разных людей мы получаем совершенно различные ответы" [15. С. 56].

В высказывании Эйнштейна содержатся две чрезвычайно важные для нашей темы мысли, кажущиеся, на первый взгляд, парадоксальными. С одной стороны, развитие науки Эйнштейн представляет закономерным процессом объективного познания окружающего мира. Так же считал и У. Гамильтон, писавший: "По своей форме наука – самая совершенная логика; по содержанию она имеет характер действительной реальной истины" (цит. по: [16. С. 31]). Еще ранее эту же мысль высказал Г. Галилей: "...если рассматривать разум с интенсивной стороны, т.е. по отношению к совершенству познания какой-либо отдельной истины, то я утверждаю, что человеческий разум некоторые истины понимает в такой полноте и знает в такой же мере безусловно, как сама природа" (цит. по: [17. С. 121]). С другой стороны, Эйнштейн утверждает, что этот же закономерный процесс научного познания не имеет четкой цели. Действительно, во все времена он реализовывался людьми, руководствовав-

шимися в своей деятельности совершенно разным пониманием предназначения науки или вообще не задумывавшимися об этом. По свидетельству многих выдающихся творцов научного мировоззрения, их занятия чистой наукой редко когда имели априорно поставленную цель. Достигнутые успехи, помимо огромного труда, являлись результатом творчества, вдохновения, импровизации, интуитивного стремления выразить себя, утвердиться в жизни, оставить свое имя потомкам и т.п. В.И. Вернадский писал: "Ученые – те же фантазеры и художники; они не вольны над своими идеями; они могут хорошо работать, долго работать только над тем, к чему лежит их мысль, к чему влечет их чувство" (цит. по: [18. С. 122]). С этим созвучны мысли Б.К. Зайцева о побудительных мотивах творчества: «В зрелости знаешь, что ни от чего мир не сдвинется – ни от твоих дел, ни от твоей жизни, ни от смерти. Некий высший смысл делания останется, конечно. Очень загадочная вещь – смысл творчества! К счастью, в душе заложен непонятный разуму закон, или таинственная сила, через года, десятилетия влекущая всех к одному: строителя – к строению, дельца – к делам, политика – к властвованию, художника – к словам, звукам, краскам. Это влечение наджизненно. В зрелости повинешься ему, как знаку свыше, и только. В юности кажется, что "дело" необходимо и для окружающего мира. Это дает, конечно, подъем огромный» [19. С. 515–516].

А. Пуанкаре, полемизируя с Л.Н. Толстым о пользе науки, утверждал: "Ученый изучает природу не потому, что это полезно, а потому, что это является для него источником наслаждения, потому, что природа полна красоты" (цит. по:[10. С. 7]). И еще: "Я не скажу, что наука полезна потому, что она снабжает нас машинами, а наоборот, что машина полезна потому, что доставляет современному человеку досуг заниматься наукой" [(цит. по:[10. С. 13]).

А.Д. Александров, полагая, как отмечалось, исключительно утилитарное происхождение науки, тем не менее считает, что «...в основе стремлений к научной деятельности лежат страсти человека: без них упорное стремление к истине и утверждение ее невозможно. Искание истины и тем более отстаивание ее, будь то в науке или в моральных проблемах, требует мужества. "Пойдем на костер, будем гореть, но от убеждений своих не откажемся", – говорил Н.И. Вавилов» (цит. по:[9. С. 16]). И ведь, действительно, пошел на зажженный в 1917 г. костер в России и сгорел в нем, показав миру, до каких высот может подняться человеческий дух и какую независимость от внешних условий он может обрести там. Подвергаемый пыткам и приговоренный к смерти, Н.И. Вавилов смог в таких условиях только по памяти написать научную монографию. Этот великий памятник человеческому уму и воле, попав к палачам, был ими уничтожен.

В своих воспоминаниях о Э. Резерфорде П.Л. Капица анализирует причины появления качественно новых фундаментальных представлений в физике. Рассматривая учение Франклина об электричестве, идею Фарадея об электродинамическом процессе как о явлении, совершающемся в окружающем проводник пространстве, трактовку Резерфорда радиоактивности как распада до того считавшейся незыблемой материи и созданную им же планетарную модель атома, Капица отмечает, что они пол-

ностью оригинальны и ни в какой мере не представляли собой логическое развитие предшествующих знаний, т.е. являлись иррациональными. На этих примерах он, кстати, показывает, что при решении некоторых научных проблем "...эрудиция не является той основной чертой, которая позволяет ученому решать задачу". И далее Капица пишет: "...тут главное – воображение, конкретное мышление и в особенности смелость. Острое логическое мышление, которое особенно свойственно математикам, при постулировании новых основ скорее мешает, поскольку оно сковывает воображение" [20. С. 296].

Вернемся к мысли Эйнштейна о кажущемся противоречии между добываемой наукой объективной информацией о реальном мире и субъективным характером научного мышления. Для раскрытия этого противоречия и выявления наиболее важных особенностей процесса научного познания ниже рассматриваются в самом общем плане следующие вопросы, определяющие взаимоотношение между познающим субъектом и исследуемым объектом: структурная организация биосферы и формирование научного мировоззрения, эволюция биосферы и познаваемость мира. Провести четкое разделение этих тем не представляется возможным, поскольку наше восприятие и понимание явлений окружающего мира есть, помимо всего прочего, результат научного мышления, а процесс формирования последнего зависит от структурной организации этого мира.

Структурная организация биосферы. Окружающий нас мир и мы сами образуем совокупность великого множества составных частей, находящихся в постоянном движении и взаимодействии. Научное познание мира заключается в получении объективной информации об этой совокупности, происходящих явлениях и их взаимосвязях. В основе любой научной деятельности лежат две аксиоматические истины: вера в объективную реальность живой и неживой природы и вера в познаваемость вещественного мира. Признание этих истин столь же необходимо для науки, как для религии признание недоступного познанию и находящегося за пределами опыта мира и вера в Благую Весть о наступлении Царства Божьего. Охватить научным мышлением все факты, все явления и выявить все взаимоотношения между ними представляется невозможным. Необходим выбор. На чем он может базироваться и в чем заключаться? «Если бы этот выбор, – отмечал К.А. Тимирязев, – зависел только от прихоти или определялся бы непосредственной пользой, то не было бы и речи о "науке для науки", т.е. не существовало бы никакой науки» [10. С. 11].

Выбор не будет зависеть от "прихоти" и "непосредственной пользы" только тогда, когда объекты исследования могут быть подразделены на важные и второстепенные, типичные и случайные. Только при этом условии знание ограниченного количества фактов и явлений позволяет вывести общие закономерности и предсказать несравненно большее число фактов и явлений, вовсе не подвергавшихся изучению. Следовательно, научное познание возможно, поскольку существуют законы природы, единые и объективные. Д.И. Менделеев подчеркивал, что обобщение становится законом природы и "...приобретает особое научное значение, когда из него есть возможность извлекать практические следствия,

т.е. логические заключения, которые объясняют не объясненное еще, указывают на явление, до сих пор не известное, и, особенно, когда оно дает возможность делать такие предсказания, которые возможно подтвердить опытом" [21. С. 125].

Существование законов природы указывает на то, что окружающий нас мир, во всяком случае его значительная часть, – это не хаотическое нагромождение тел, а система, имеющая сложную структурную организацию. В основе ее построения и развития лежат два принципа, определяющие взаимодействия между элементами системы, – унификационный принцип строения простых составляющих и комбинационный принцип более сложных. Так, малое число одних и тех же элементарных частиц образует ограниченное количество атомных систем – элементов, которые, взаимодействуя друг с другом, составляют практически бесконечное множество соединений – молекулярных систем. Все атомы имеют однотипную, водородоподобную структурную организацию, известную как модель Резерфорда–Бора. Образование из атомов молекулярных систем подчиняется единым закономерностям. У всех веществ, независимо от агрегатного состояния, универсальны по своей природе межмолекулярные и внутримолекулярные взаимодействия атомов.

В принципе та же ситуация в живой природе. Все биосистемы имеют клеточную организацию с однотипным строением клеток, органелл, генетического аппарата и т.д. У всех видов животных и растений гены построены из одних и тех же четырех нуклеотидов, а белки – из одних и тех же двадцати аминокислот. В процессе дивергентного эволюционного развития совершенствование и усложнение биосистем происходит путем дифференциации и объединения уже существовавших структур с образованием новых связей, т.е. путем добавления и комбинирования, а не кардинальной переделки прежней структурной организации. Таким образом, наличие у природы структурной организации сделало возможным появление научного мышления. "Представим себе, – писал К.А. Тимирязев в 1920 г., – что бы было, если бы вместо наших 60 элементов, их существовало бы 60 млрд. Каждый камень представлялся бы нам чем-то совершенно новым, все известное нам об остальном было бы нам не в прок... А каково было бы положение биологии, если бы существовали бы только неделимые особи, не было бы видов, дети не походили бы на родителей" [10. С. 11].

Все природные явления в зависимости от степени взаимообусловленности свойств целого от свойств его отдельных частей составляют очень длинную практически непрерывную последовательность. С некоторой долей условности ее можно разделить на три группы, в каждой из которых будут находиться явления с характерным только для них отношением между макросистемой и ее микросоставляющими.

Первую группу образуют явления, определяемые исключительно свойствами или отдельных микросистем, их внутренним строением (атомные и молекулярные спектры, химические реакции и т.п.), или макросистем, но при условии, что они проявляют себя как целое (колебания маятника, полет спутника, обращение планет и т.п.). С изучения явлений этой группы началось научное познание мира, приведшее к созданию сначала

классической физики, а позднее квантовой механики. Стали известны основные физические законы и действующие в природе фундаментальные силы. Для явлений этой группы характерны обратимость, жесткий детерминизм и строгая причинная обусловленность. И. Пригожин и И. Стенгерс, оценивая с позиции сегодняшнего дня науку, изучающую такие явления, выделяют следующие ее признаки ограничительного порядка: "В классической динамике особенно ярко и четко запечатлен статический взгляд на природу. Время низведено до роли параметра, будущее и прошлое эквивалентны. Квантовая механика подняла много новых проблем, не затронутых классической динамикой, но сохранила целый ряд концептуальных позиций классической динамики, в частности, по кругу вопросов, относящихся ко времени и процессу" [22. С. 52–53].

На противоположном конце нашего ряда, во второй группе, находятся явления, которые не зависят от строения микроскопических частиц и специфических взаимодействий между ними, а следовательно, и от конкретных механизмов протекания процессов. Такие явления обусловлены интегральными свойствами характеристического ансамбля с колоссальным количеством "безликих" и независимых друг от друга участников. К ним относятся многие процессы, протекающие в газах, жидкостях, твердых телах: диффузия, теплопроводность, растворимость, осмос, кинетика химических реакций и т.п. Описание поведения таких систем вне компетенции классической физики и квантовой механики. Это область равновесной термодинамики и статистической физики. Построение "науки о тепле" началось на чисто феноменологической основе с постулирования двух универсалий – принципа сохранения энергии и принципа возрастания энтропии. Установление второго начала термодинамики и введение понятия о необратимости самопроизвольно протекающих процессов существенно обогатили представление о времени. Обнаружилось неведомое для классической физики его свойство – направленность, критерием которой служит знак изменяющейся по ходу необратимого процесса энтропии.

Таким образом, для первого круга явлений характерны обратимость и жесткий детерминизм, индифферентность времени к прошлому и будущему, а для второго – необратимость и вероятность, направленность времени. Изучение этих крайних структурных организаций вещественного мира привело к разработке двух крупных областей знаний, двух научных мировоззрений – детерминированного и статистического. Для первой области изначально характерен индуктивный подход, для второй – дедуктивный. Каждой области знаний присущи свои специфические, независимые друг от друга законы, которые А. Эддингтон разделил на первичные и вторичные [23]. Первым подчиняется поведение отдельных частиц, а вторым – большие ансамбли частиц.

Подавляющее большинство явлений, определяемых внутренним строением и взаимодействием микрочастиц, в силу чисто математических трудностей оказываются слишком сложными для их строгого описания с помощью априорного подхода и известных фундаментальных закономерностей, которым эти явления безусловно следуют. Выход ищут в разработке приближенных эмпирических методов, в привлечении дополнительного экспериментального материала, в упрощении моделей и расчетных

схем. Примерами могут служить многочисленные полуэмпирические методы квантовой механики атомов и молекул, классические теории гармонических колебаний и вращений молекул и т.д.

Что же касается явлений с участием множества частиц, то здесь имеются трудности более принципиального характера. Поведение реальных макроскопических ансамблей, подчиняясь аксиоматическим началам термодинамики, в той или иной мере, но в принципе всегда не соответствует выведенным из моделей идеального газа и идеального раствора закономерностям. Трудности, возрастающие с ростом давления, понижением температуры, увеличением концентрации и переходом от изолированных систем к закрытым и открытым, преодолеваются также с помощью эмпирического подхода: введением в законы идеальных газов и растворов поправок, например, на собственный объем микрочастиц и их взаимодействия (уравнение Ван-дер-Ваальса); переходом к использованию эффективных параметров (активностей и фугитивностей), сохраняющих формы идеальных законов; добавлением частных эмпирических постулатов (линейная неравновесная термодинамика). Таким образом, увеличение возможностей в исследовании явлений двух отмеченных выше групп происходит путем разработки приближенных эмпирических методов, т.е. за счет отказа от априорных, чисто теоретических поисков. В обоих случаях фундаментальные основы остаются неизбылемыми, следовательно, качественных изменений не претерпевают и соответствующие научные мировоззрения.

Причинно обусловленные явления природы, изучаемые классической физикой и квантовой механикой, не участвуют в эволюционном развитии биосферы, так как обратимы во времени. Если бы происходили только такие явления и необходимость всегда была следствием необходимости, то мир оставался бы качественно неизменным. И. Пригожин по этому поводу писал: "Все, что дает классическая физика, сводится к утверждению: изменение есть не что иное, как отрицание возникновения нового, и время есть всего лишь параметр, не затрагиваемый преобразованием, которое он описывает. Образ устойчивого мира – мира, избегающего процесса возникновения, вплоть до нашего времени оставался идеалом теоретической физики. Динамика Исаака Ньютона, дополненная его великими последователями: Пьером Лапласом, Жозефом Лагранжем и сэром Уильямом Гамильтоном, представляла собой замкнутую универсальную систему, способную дать ответ на любой поставленный вопрос. Любой вопрос, на который динамика не могла дать ответ, отвергался как псевдопроблема, почти по определению" [24. С. 41].

В чисто статистических явлениях хаотического ансамбля свобода является продуктом свободы. Если бы только совершались явления, в которых меньший беспорядок порождал больший беспорядок, то эволюция мира была бы направлена к равновесному состоянию с максимальным значением энтропии, к вечному и полному покою. Такая перспектива развития отражена в концепции "тепловой смерти", сформулированной У. Томпсоном в 1852 г. Л.Д. Ландау и Е.М. Лифшиц, обсуждая второе начало термодинамики, отмечают: "Согласно результатам статистики Вселенная должна была бы находиться в состоянии полного статистического равно-

весья. Между тем ежедневный опыт убеждает нас в том, что свойства природы не имеют ничего общего со свойствами равновесной системы..." [25. С. 15].

Изучение как строго детерминированных, так и часто статистических процессов не ответило, да и не могло ответить, на вопрос о механизме совершающихся в природе процессов структурной самоорганизации, т.е. о спонтанном переходе хаоса в порядок, когда необходимость является продуктом свободы. Такие процессы имеют место в физических, химических и биологических системах. Если бы в живой и неживой природе происходили только что рассмотренные явления двух групп, расположенных на противоположных концах нашего ряда, то невозможно было бы не только совершенствование живых организмов, но и само их возникновение; более того, вообще отсутствовал бы какой-либо порядок даже на элементарном атомно-молекулярном уровне.

К самопроизвольному возникновению качественно новых структурных образований в природе приводят явления третьей группы, занимающей промежуточную часть ряда. Они подробно рассматривались в предшествующем томе настоящего издания [26]. Напомню, что их сущность заключается в неразрывной связи макроскопических и микроскопических свойств системы или, иными словами, во взаимообусловленности детерминистического и статистического поведения ансамбля; необходимость здесь есть продукт свободы.

Итак, существуют три мира явлений. Мир одних, провозглашенный в физике Ньютоном в 1687 г., качественно неизменен. Мир других, провозглашенный в термодинамике Клаузиусом в 1850 г., деструктивен. И, наконец, мир третьих, провозглашенный в биологии Дарвиным в 1859 г. и в естествознании Пригожиным в 1980 г., созидателен и склонен к эволюционному саморазвитию. Три мира – три научных мировоззрения – три языка, на которых человечество одновременно ведет диалог с природой. Явления первой и второй групп, как уже отмечалось, подчиняются принципиально разным законам природы (детерминистическим и статистическим соответственно), совокупности которых образуют их научные фундаменты. Представления, выработанные для описания явлений одной группы, не могут быть использованы для описания другой. Так, термодинамические функции состояния (температура, энтропия, свободная энергия и др.) теряют смысл для объектов и явлений, изучаемых классической физикой и квантовой механикой. В то же время такие физические понятия, как координаты, импульсы и траектории движения микрочастиц, волновая функция, уравнение Шредингера и др., неприемлемы для равновесной термодинамики. Явления третьей, промежуточной, группы не потребовали для своего описания раскрытия новых фундаментальных законов природы. Новизна рождающихся в результате статистико-детерминистических процессов структурных образований не в особых, ранее неизвестных свойствах микроскопических элементов, а в макроскопических организациях этих элементов с упорядоченной системой связей. Качественные изменения, происходящие при спонтанном переходе системы от хаоса к порядку, возникают благодаря кооперативному эффекту, проявляющемуся в процессе реализации возможностей микроскопических

составляющих при установлении между ними когерентных или иных, но обязательно строго согласованных взаимодействий.

Формирование научного мировоззрения. Историческое развитие научного мышления – это хронологический порядок познания естественных законов и все более глубокое проникновение в суть структурной организации природы. Данное обстоятельство делает развитие научного мышления объективным и, казалось бы, четко predeterminedным в отношении направленности и конечной цели процессом познания. Этот процесс имеет также свою структурную организацию, которая с течением времени совершенствуется и приближается к структурной организации своего оригинального источника – природы, являющейся, таким образом, для процесса познания аттрактором.

Ранее было отмечено, что структурная организация живой и неживой природы построена согласно принципам унификации и комбинации и включает явления трех типов. Оба принципа (редукционизма и холизма) оказались в основе научного поиска и нашли отражение в логике, как в науке о закономерностях и формах научного и философского мышления, так и в методе анализа индуктивного и дедуктивного способов рационалистической и эмпирической деятельности человека. На индуктивном способе мышления основывается разработка целого ряда научных дисциплин, например квантовой механики атомов и квантовой химии молекул. Фундаментальные положения этих наук базируются в основном на результатах изучения соответственно простейшего атома (H) и простейшей молекулы (H_2), а также ионов H^+ , OH^- . Тот же способ мышления в биологии лег в основу исследований, приведших к становлению и развитию формальной и молекулярной генетики, цитологии, молекулярной биологии, многих других областей. При дедуктивном способе мышления, ядро которого составляет силлогистика Аристотеля, новое положение выводится или путем логического умозаключения от общего к частному, или постулируется. Классическим примером дедукции может служить аксиоматическое построение геометрии. Мышление такого типа наглядно проявилось в создании периодической системы элементов – эмпирической зависимости, обуславливающей свойства множества лишь одним, общим для него качеством. Д.И. Менделеев установил, что "свойства элементов, а потому, и свойства образуемых ими простых и сложных тел стоят в периодической зависимости от их атомного веса" [21. С. 111]. Тот же подход лежит в основе построения равновесной термодинамики и статистической физики. Оба способа мышления, индуктивный и дедуктивный, диалектически связаны между собой. Они вместе присутствуют в конкретных исследованиях, чередуясь и контролируя выводы друг друга.

Процесс научного познания возможен только при изучении типичных и важных для рассматриваемого явления фактов. Однако заранее не известно ни качество, ни количество таких фактов. Выбранные же первоначально являются лишь предположительно типичными и важными. Количество фактов, принятых за второстепенные и случайные, обычно бывает значительно больше первых. Вспомним, например, признаки искусственных классификаций растений и животных, количество которых практически неограничено. В то же время признаки естественной классификации

живых организмов объективны и образуют единичный набор. На выбор типичных и важных признаков здесь потребовалось более двух тысячелетий. Случайность при наличии тайны неизбежна. Ее вероятность возрастает из-за творческого характера научной работы. Темы, проблемы, объекты исследования, утверждает В.И. Вернадский, ученый выбирает "... в зависимости от своей духовной личности – интуиции и вдохновения – в теснейшей связи со своим научным мировоззрением, значительная часть которого (у многих ученых – большая) опирается не на научные эмпирические обобщения... Эта творческая работа есть проявление личности. Для нее так же мало можно найти общеобязательные для всех единые нормы, как мало можно найти их для понимания и переучивания определенным путем философского и религиозного искания" [27. С. 314].

В общем случае можно полагать, что при решении научной проблемы отбор фактов производится в значительной мере интуитивно, побудительные мотивы исследования и формулировка цели – субъективны, а постановка и проведение работ разными учеными – независимы. При этих условиях данные, полученные при решении той же проблемы в различных научных центрах, могут оказаться несовпадающими. Рано или поздно они четко разделятся на две группы. В одну войдут подтвержденные последующим изучением, и следовательно, правильные результаты, а в другую – не подтвержденные опытом или опровергнутые им неправильные результаты. Последние в своей массе утрачивают для науки значение. Однако процесс научного познания далеко не всегда столь прямолинеен и однозначен. Развитие науки знает много примеров, когда заблуждения оказывались не чем-то внешним и исключительно негативным, а нередко естественным образом входили в механизм научного творчества как неизбежный и даже необходимый элемент. По мнению А. Койре, история науки не является "... хронологией открытий или, наоборот, каталогом заблуждений..., но историей необычных приключений, историей человеческого духа, упорно преследующего, несмотря на постоянные неудачи, цель, которую невозможно достичь, – цель постижения или, лучше сказать, рационализации реальности. Историей, в которой, в силу самого этого факта, заблуждения, неудачи столь же поучительны, столь же интересны и даже столь же достойны уважения, как и удачи" (цит. по: [28. С. 51]). Примерами подобных заблуждений из далекого прошлого могут служить учение Аристотеля о легких и тяжелых телах, геоцентрическая система мира Птолемея, теория теплорода Р. Бойля и теория флогистона Г. Штала.

Происшедшие в наше время (80-е годы) кардинальные изменения в естествознании вызваны, как уже отмечалось, становлением новой области знаний – физики неравновесных процессов, протекающих в открытых системах вдали от положения равновесия. В результате, представление о мире как о стационарной, устойчиво функционирующей рациональной системе оказалось несостоятельным. Мир предстал многовариантным, полным случайных явлений и непредсказуемых иррациональных событий, не поддающихся логическому познанию. Поэтому произошло или обязательно должно произойти смещение научного видения от простой, вечной и обратимой реальности в сторону ее множественности, темпоральности и

необратимости, что, в свою очередь, должно коренным образом изменить представление об аттракторе познания как о конечной, поляризующей научный процесс цели.

Глобальная для естествознания стратегическая задача ранее состояла в обретении научным мировоззрением такой структурной организации, которая была бы тождественна реальному миру, считавшемуся замкнутой стационарной динамической системой. С утратой такого представления исчезла и такая задача, точнее, она стала касаться теперь только тех явлений, для которых характерен жесткий детерминизм, строгая причинная обусловленность и обратимость. Нестабильность и неравновесность природных явлений, спонтанно порождающих принципиально новые структуры, лишили науку ее былой ясной телеологической цели и, следовательно, предопределенной и четкой направленности развития от простого к сложному.

Оказалось, что реальный мир – это процесс, который благодаря присутствию ему неравновесности и случайности постоянно меняется непредсказуемым образом. Кем, например, могло быть запланировано в период триас или в пермский период зарождение в последующем юрском периоде млекопитающих? Кто мог предвидеть появление в третичном периоде их многочисленных видов? А разве не было случайным возникновение в олигоцене человекообразных обезьян и появление в конце плиоцена или в нижнечетвертичном периоде питекантропа, синантропа и других, позднее угасших предгоминидов? Нет сомнений также в случайности и автономности выступления среди многих эволюционных линий вида *Homo sapiens*, так сильно повлиявшего на состояние биосферы. Разработанные Пригожиным теории диссипативных структур и бифуркационных флуктуаций описывают неравновесные процессы открытых систем, раскрывают их статистико-детерминистическую природу и указывают направление количественного изучения.

Вернемся теперь к нашей теме, касающейся формирования научного мировоззрения. Мы остановились на констатации того факта, что развитие науки представляет собой самопроизвольно протекающий необратимый процесс познания, суть которого состоит в установлении естественных закономерностей (законов природы) и обретении более полного и глубокого представления о структурной организации природы путем в значительной мере несогласованной деятельности многих ученых. Эта деятельность, как отмечалось, приводит к получению результатов, которые со временем могут быть отнесены к правильным или неправильным. По отношению к научному мировоззрению и те и другие можно считать флуктуациями. Правильные результаты окажут незатухающее воздействие на систему знаний, и их следует отнести к необратимым флуктуациям, а неправильные, прямо не повлиявшие на состояние системы, – к обратимым флуктуациям. Накопление правильных результатов приведет в свое время к скачкообразному качественному изменению научного мировоззрения.

Описанный процесс научного познания на языке термодинамики можно назвать нелинейным неравновесным процессом, протекающим вдали от положения равновесия и приводящим к спонтанному возникновению

порядка из хаоса. Очевидное упрощение заключается в предположении о независимой мотивации научного мышления ученого. Конечно, образование, литература, конгрессы и личные контакты в той или иной мере оказывают влияние на выбор, направления научного поиска и методику исследования. Однако принципиально важно отметить то обстоятельство, что любое внешнее воздействие на научное мышление человека, особенно талантливого, не является однозначным и предсказуемым.

Если историческое развитие науки действительно представляет собой самопроизвольный статистико-детерминистический процесс совершенствования структурной организации научного мировоззрения, то механизм этого процесса должен описываться бифуркационной термодинамической моделью. Следовательно, ему должны быть свойственны закономерности, присущие явлениям возникновения из хаоса пространственно-временных упорядоченных структур как в естественных, так и в экспериментальных диссипативных системах. Непременное условие появления такой структуры заключается в энергетическом и/или материальном обмене диссипативной системы с окружающей средой. В отличие от самопроизвольных равновесных процессов, при которых все части системы хаотизируются и, следовательно, вносят положительный вклад в общее увеличение энтропии, в нелинейных неравновесных процессах в закритической области имеет место диспропорционирование энтропии между подсистемами, происходящее без нарушения второго начала термодинамики. Уменьшение энтропии при создании упорядоченной структуры сопровождается одновременным, большим по абсолютной величине, увеличением энтропии остальной части изолированной системы. Сходство в этом отношении эволюции научного мировоззрения с известными процессами структурной самоорганизации физических, химических и биологических открытых систем представляется очевидным.

Макроскопическое спонтанное структурирование обусловлено кооперативностью поведения микроскопических составляющих, возникающего внезапно в момент достижения внешним фактором своего критического значения. В докритической области все состояния системы могут быть получены из равновесного состояния медленной непрерывной деформацией равновесных структур. Последовательность таких состояний образует так называемую термодинамическую ветвь. Отвечающие ей процессы имеют аддитивный характер. К ним относятся, например, ламинарное течение жидкости, диффузия и все другие потоки вещества и энергии, которые в определенном диапазоне внешних условий являются линейными функциями термодинамических сил – градиентов соответствующих потенциалов (температуры, давления, концентрации и др.). При выходе за область критических значений градиентов линейные потоки размываются и у систем возникают совершенно новые упорядоченные структуры, работающие в стационарном режиме (их-то и назвал Пригожин диссипативными). В момент появления такой структуры на термодинамической ветви возникает резкий излом – бифуркация. Ход исторического развития научного познания также может быть представлен нелинейным неравновесным процессом, включающим термодинамические ветви, разделенные бифуркациями. На начальном этапе, до первой критической точки,

становление и развитие науки состояли из спорадически появляющихся и не связанных друг с другом исследований, что свидетельствовало о возникновении новой формы духовной жизни человека – научного мышления, но отнюдь не означало одновременного появления научного мировоззрения.

К самым первым примерам подлинно научного творчества, направленного на поиск истины, можно отнести работы Архимеда о центрах тяжести тел и рычагах, опыты по определению удельного веса, учение о плавании тел. Строго научной в течение более полутора тысяч лет оставалась эпициклическая система мира по Птолемею. "Должен был явиться Ньютон, – писал В.И. Вернадский, – чтобы окончательно решить с формальной точки зрения этот вопрос и сделать в науке невозможными все изменения и приспособления птолемеевой системы" [2. С. 50]. К научной следует отнести классификацию Гиппократом людей по темпераменту, в которой, по мнению И.П. Павлова, были уловлены в массе бесчисленных вариантов человеческого поведения наиболее капитальные черты. К научным разработкам чрезвычайно крупного масштаба принадлежат первые системы животных Аристотеля и растений Теофраста, принципиальные схемы которых смогли быть усовершенствованы лишь через две с лишним тысячи лет. Провидческой оказалась идея Аристотеля об иерархической организации живой природы. Его "Лестница Природы" явилась началом нити Ариадны в поиске структурного построения органического мира. До самого конца XVII в. научное мировоззрение, однако, отсутствовало. Наука развивалась кумулятивным образом в сравнительно немногочисленных и мало связанных между собой центрах. Приобретаемые знания не складывались в систему, имеющую определенную структурную организацию. Процесс научного познания оставался прерывистым и лишенным способности к саморазвитию. Из интеллектуальных сфер человеческой деятельности доминировали религия, искусство, философия. Состояние науки в первой докритической области отвечало пригожинской термодинамической ветви (режиму "лампы накаливания").

Обретение наукой своей первой структурной организации произошло за очень короткий промежуток времени в конце XVII в. Этот акт сначала коснулся только физических знаний и был вызван научным творчеством одного человека – Исаака Ньютона. Именно ему выпала честь инициировать первую в науке бифуркационную флуктуацию, которая привела к структурированию накопившихся физических знаний, превысивших критический объем. В результате возникло физическое (механистическое) мировоззрение. В химии становление первой структурной организации произошло через сто лет, на рубеже XVIII–XIX вв. Оно обязано А. Лавуазье, заложившему основы современной химии, и Д. Дальтону, разработавшему учение о химической атомистике. Критическая фаза в развитии биологии, как науки об общих закономерностях всего живого, приходится на середину XIX в. Она вызвана созданием Т. Шванном и М. Шлейденом клеточной теории и Ч. Дарвиным теории эволюции.

Одна из специфических особенностей научного мировоззрения заключается в том, что его структура, в отличие от обычных диссипативных физических, химических и биологических структур, не может находиться в

стационарном состоянии и эволюционировать вспять. Пока существует жизнь и развивается человечество, будет совершенствоваться структурная организация научного мышления. Имея в виду эту сторону науки, В.И. Вернадский писал: "Она полна непрерывных изменений, исправлений и противоречий, подвижна чрезвычайно, как жизнь, сложна в своем содержании; она есть динамическое неустойчивое равновесие... Научная мысль – научное творчество – научное знание идут в гуще жизни, с которой они неразрывно связаны, и самим существованием своим они возбуждают в среде жизни активные проявления, которые сами по себе являются не только распространителями научного знания, но и создают его бесчисленные формы выявления, вызывают бесчисленный крупный и мелкий источник роста научного знания" [27. С. 53–54].

Три области естественнаучных знаний – физика, химия и биология – скреплены друг с другом постоянно усложняющейся сетью прямых и обратных связей. Поэтому последовательное обретение ими своих структурных организаций не случайно. Так, возникновение химического мировоззрения стало возможным не только потому, что собственный научный материал достиг необходимой критической массы, но и благодаря структурно оформившимся к этому времени физическим знаниям. В принципе та же ситуация имела место в случае биологических знаний. В отсутствие физического и химического мировоззрения они не смогли бы принять свою первую более или менее упорядоченную структурную организацию.

Развитие естественных наук далеко не сразу достигло уровня, необходимого для установления фундаментальных зависимостей между явлениями живой и неживой природы. Долгое время, вплоть до второй четверти XX в., физическое, химическое и особенно биологическое мировоззрения развивались в значительной мере независимо. Это был период раздельного естествознания, т.е. в значительной мере автономного существования трех его основных областей. Совершенствование их структурных организаций здесь происходило главным образом за счет локальных, возникающих в пределах отдельных областей, бифуркационных изменений, резко обрывавших термодинамические ветви кумулятивного накопления научных данных. Локальными физическими бифуркациями можно считать, например, становление термодинамики и статистической физики, создание теории электромагнитного поля и теории относительности, разработку квантовой механики. Эти и ряд других выдающихся достижений физики открывали пути к изучению совершенно новых явлений, приводили к качественно новым понятиям, к коренному пересмотру существовавшего физического мировоззрения. Конечно, локальными они оставались недолго, но их воздействие на другие области естествознания осуществлялось через изменение структурной организации физических знаний, физического мировоззрения.

В химии после возникновения первого собственного научного мировоззрения локальными бифуркациями, безусловно, следует считать создание классической теории химического строения, стереохимии углеродных молекул, периодической системы элементов. На структурную организацию биологических знаний существенно повлияло возникновение вирусологии, хромосомной теории наследственности, теории мутаций, классиче-

ской генетики и др. По мере развития физики, химии и биологии стали обретать структурные организации также промежуточные области знаний. Примером здесь может служить квантовая механика молекул (квантовая химия), образование которой произошло вследствие бифуркационных взаимодействий физических и химических знаний. Во второй половине XX в. в естествознании произошли события, свидетельствующие о глобальной интеграции естественнонаучных знаний и появлении контуров единого для живой и неживой природы научного мировоззрения.

Учение о ноосфере. Исключительность вида *Homo sapiens*, его центральный феномен, заключается в присущей только человеческому разуму способности к рефлексизирующему, интроспективному мышлению, т.е. умению сосредоточиться на самом себе и овладеть собой как объектом, умению не просто познавать, а познавать наряду с окружающим миром самого себя и критически оценивать приобретаемые знания. Ч. Дарвин писал: "Нравственным существом мы называем такое, которое способно сравнивать свои прошлые и будущие поступки и побуждения, одобрять одни и осуждать другие. То обстоятельство, что человек есть единственное существо, которое с полной уверенностью может быть определено таким образом, составляет самое большое из всех различий между ним и низшими животными" [29. С. 401]. Способностью чувствовать и вырабатывать навык, разумеется, наделено и животное. "Но, безусловно, – отмечает П. Тейяр де Шарден, – оно не знает о своем знании – иначе оно давным-давно умножило бы изобретательность и развило бы систему внутренних построений, которая не ускользнула бы от наших наблюдений. Следовательно, перед животными закрыта одна область реальности, в которой мы развиваемся, но куда оно не может вступить... Будучи рефлексизирующими, мы не только отличаемся от животного, но мы иные по сравнению с ними. Мы не простое изменение степени, а изменение природы, как результат изменения состояния" [1. С. 137]. Реализация уникальных возможностей человека в приобретении научных знаний и в их практическом использовании оказала колоссальное воздействие на биосферу, что в конечном счете привело к становлению нового периода в развитии Земли. В 1926 г. В.И. Вернадский отмечал: "Созданная в течение геологического времени, установившаяся в своих равновесиях биосфера начинает все сильнее и глубже меняться под влиянием научной мысли человечества. Вновь создавшийся геологический фактор – научная мысль – меняет явления жизни, геологические процессы, энергетику планеты" [30. С. 232]. В.И. Вернадский и П. Тейяр де Шарден в конце 30-х годов XX в. декларировали неизбежность вступления биосферы в качественно новое состояние – царство разума, или ноосферу. Придерживаясь различных мировоззренческих позиций, они оказались тем не менее едиными в утверждении, что человечество начинает строить свою деятельность и свои отношения с природой на строго научной основе и скоро сможет сознательно управлять в глобальном масштабе земными и социальными процессами, ранее протекавшими стихийно.

Тема геологической деятельности человека и эволюции биосферы сегодня является как никогда актуальной, поскольку от решения составляющего эту тему сложнейшего комплекса проблем стала зависеть в

настоящее время судьба самого человечества. Рассмотрение ее начнем с анализа некоторых аспектов учений Вернадского и Тейяра де Шардена, все еще остающихся наиболее последовательными в изложении эволюции биосферы.

Эволюционное учение Тейяра де Шардена. Свое учение автор определил как "введение к объяснению мира", призванное "охватывать не только внешнюю, но и внутреннюю сторону вещей, не только материю, но и дух" [1. С. 40]. Философской основой учения является панпсихизм (гилозоизм) – учение об универсальной одушевленности материи. Автор исходит из предположения, что направление эволюционного процесса ("ось развития") ориентировано исключительно на человека, которого он считает "центром перспективы эволюции". Содержание же эволюционного процесса Тейяру де Шардену видится в росте и совершенствовании сознания. "История жизни, – считает он, – есть, по существу, развитие сознания, завуалированное морфологией..." [1. С. 138]. У человека, в отличие от остального мира, внутренняя, психическая сторона деятельности достигает высшей фазы своего развития – уровня разума или состояния мысли, и благодаря этому проявляется с полной очевидностью. С его точки зрения, человек является не только "центром перспективы эволюции", но и "центром конструирования универсума", т.е. венцом всего мироздания, а не только биосферы. Далее, Тейяр де Шарден полагает, что между сознанием и структурной организацией материи имеется нечто вроде симбатной зависимости: чем сложнее организация материи, тем выше уровень ее сознания. Под сознанием он подразумевает психику любого рода – от самых элементарных форм внутреннего восприятия простейших структур до мыслительного познания человека. "Раз в одной точке самой себя ткань универсума, – пишет он, – имеет внутреннюю сторону, то она неизбежно двусторонняя по самой своей структуре..." [1. С. 55]. Иными словами, если человек обладает материальной и духовной (психической) сторонами, то двусторонним должен быть любой объект живой и неживой природы, входящий в любую область ткани универсума.

Если сознанием в той или иной мере наделены все организмы и тела, независимо от их сложности, то естественен вопрос об особенностях сознания человека. Центральный феномен человека, по мнению Тейяра де Шардена, заключается в том, что его сознание, и только его, является рефлексивным. "Рефлексия, – считает он, – это приобретенная сознанием способность сосредоточиться на самом себе и овладеть самим собой как предметом, обладающим своей специфической устойчивостью и своим специфическим значением, – способностью уже не просто познавать, а познавать самого себя; не просто знать, а знать, что знаешь. ... Рефлексивное существо в силу самого сосредоточивания на самом себе внезапно становится способным развиваться в новой сфере. В действительности это возникновение нового мира" [1. С. 136].

Обретенная человеком способность к рефлексивному мышлению коренным образом преобразует его жизнь. Во-первых, она изменяет отношение человека к самому себе. Благодаря рефлексии он не расплывается в окружающем мире и среди массы ему подобных. Человек индиви-

дуализируется, превращается в разумный центр, все глубже осознающий свою собственную, персональную структурную организацию, необходимость личной свободы. Человек становится способным к индивидуальной духовной эволюции, к сознательному самосовершенствованию. Во-вторых, рефлекслирующее мышление изменяет отношение человека к окружающему обществу, способствуя его усилению и обогащению. Существа, обладающие низким уровнем сознания и лишённые личностных качеств, не могут оказывать активное преобразующее воздействие на общество. Напротив, они постоянно находятся под пассивирующим их состояние давлением безликого коллектива, грубой силы, инстинктов. При таких условиях назначение живого существа в цепи поколений исключает жизнь для самого себя; она сводится к ее поддержанию, воспроизведению и передаче в рамках физиологии. В этом случае жизнь, по выражению Тейяра де Шардена, становится более реальной, чем живые существа. Открытое общество, возникшее естественным образом и состоящее из независимо мыслящих граждан (индивидуальностей, личностей), всегда свободнее, устойчивее, гуманнее и чувствительнее к изменениям внешних условий закрытого общества коллективистского типа, построенного искусственно по умозрительной схеме и неизбежно состоящее из психически более примитивных членов со слабо развитым или слабо проявляющимся рефлекслирующим мышлением. Структурная организация любой открытой системы функционирует тем эффективнее и разнообразнее, чем совершеннее и уникальнее структурные организации составляющих ее элементов.

Итак, центральная идея Тейяра де Шардена сводится к постулированию ортогенетического, т.е. predetermined, развития материи путем совершенствования сознания, ориентированного к мысли человека, развёртыванию внутренней сущности материи в сторону человеческого разума. В соответствии с этой идеей, минувшую историю и будущее Земли он делил на четыре периода, отвечающих качественно разным формам сознания, – преджизнь, жизнь, мысль и сверхмысль. В период преджизни произошло формирование планеты. В ограниченном, хотя и очень большом, объеме индивидуализированной земной материи сконцентрировалась определенная масса элементарного сознания в форме внутренней энергии образовавшихся химических элементов и соединений. Наиболее высокоэнергетичной оказалась поверхностная оболочка молодой Земли, и именно здесь вскоре вспыхнула жизнь, произошел переход от геогенеза к биогенезу. Период жизни – это время возникновения и развития живого вещества – становления биосферы, время рождения и прорастания в минеральном мире под воздействием Космоса древа жизни, время расцвета живой природы. Самой высокой частью древа жизни оказалась ветвь класса млекопитающих, а самой совершенной ее частью – ответвление отряда приматов. Его появление в эволюционном процессе стало результатом совершенствования не внешней морфологической стороны живого организма, а сознания, т.е. его внутренней, духовной сущности. Тейяр де Шарден по этому поводу замечает: "... У приматов эволюция, пренебрегая всем остальным и, следовательно, оставляя его пластичным, затронула непосредственно мозг. Вот почему в восходящем

движении к наибольшему сознанию они оказались впереди. В этом привилегированном и единственном случае частный ортогенез филы точно совпал с магистральным ортогенезом самой жизни" [1. С. 132].

Начало периода мысли знаменуется появлением около 30 тысяч лет тому назад из "пучка" неандертальцев человека, морфологически почти не отличающегося от ныне живущих людей. В его деятельности впервые в истории Земли обнаруживаются признаки индивидуальной духовной жизни и отражается представление о людском сообществе как о некоей целостности. Возникшая у нашего пращура неведомая ранее рефлексирующая мысль проявилась в зарождении религиозной духовной силы, сплотившей людей и придавшей смысл их существованию, в появлении искусства, морали, права. Таким образом, психогенез, сменивший период жизни – биогенез, привел к появлению наряду с существовавшим уже интуитивным сознанием также рефлексирующего мышления, т.е. разума. Именно он, а не труд создал человека. Совершенствование духовной жизни человечества представляло собой процесс становления новой эволюционной фазы биосферы – фазы ноогенеза. П. Тейяр де Шарден пишет: «... Если изучение прошлого и позволяет нам сделать некоторую оценку ресурсов, которыми обладает организованная материя в рассеянном состоянии, то мы еще не имеем никакого понятия о возможной величине "ноосферной" мощности. Резонанс человеческих колебаний в миллионы раз! Целый покров сознания, одновременно давящий на будущность! Коллективный и суммированный продукт миллионов лет мышления!... Попытались ли мы когда-либо представить, что представляют собой эти величины?» [1. С. 224]. Сознание, которое, с его точки зрения, все время эволюционировало в формирующейся материи по восходящей линии, достигает в ноосфере своего апогея – состояния гармонии тройного единства – структуры, механизма и развития. Единство структуры заключается в исчезновении границ между естественным и искусственным. Если все то, что создано человеком и, следовательно, считается искусственным, не отбрасывается эволюционным потоком, то оно становится гоминизированным, естественным. Единство механизма эволюционного процесса Тейяр де Шарден видит в сходстве случайных мутаций и человеческих изобретений. "Ибо в конце концов, – полагает он, – если действительно наши "искусственные" сооружения не что иное, как закономерное продолжение нашего филогенеза, то столь же закономерно и изобретение... может рассматриваться как осознанное продолжение скрытого механизма, регулирующего произрастание всякой новой формы на стволе жизни. ... Дух поисков и завоеваний – это постоянная душа эволюции" [1. С. 178–179]. Развитие – это совершенствование и распространение сознания. Человек в этом эволюционном процессе, по его мнению, представляет "уходящую ввысь вершину великого биологического синтета. Человек, и только он один, – последний по времени возникновения, самый свежий, самый сложный, самый радужный, многоцветный из последовательных пластов жизни" [1. С. 179].

Обретя способность к рефлексирующему мышлению, человек впервые в истории планеты получил возможность судить о жизни и критически воспринимать ее. В результате, как считает Тейяр де Шарден, человек

понял, что его собственная судьба и судьба всего мира находятся в его руках. Если это действительно так, то очевидно, что "... двигать вперед ноогенез мы согласимся лишь при одном условии, что требуемое от нас усилие имело шансы на успех и повело нас как можно дальше. Животное может, очертя голову, ринуться в тупик или к пропасти. Человек никогда не сделает ни одного шага в направлении, которое, как он знает, бесперспективно" [1. С. 183–184]. О том, в какой мере справедливы эти слова, речь еще впереди, а сейчас отметим мнение Тейяра де Шардена о будущем эволюционного процесса. Будущее универсума – это будущее человечества, а оно состоится, если человек, совершенствуясь (индивидуально и коллективно), будет иметь возможность реализовать свое неистребимое желание раскрывать самого себя. Будущего может не быть в том случае, если существует состояние абсолютно совершенного разума, т.е. если развитие мысли имеет предел. Но это исключено, поскольку присущее человеку рефлекслирующее мышление противоречит предположению, будто оно может достичь потолка или повернуть вспять.

На протяжении всей истории каждый период развития нашей планеты характеризовался определенным соотношением между уровнем сознания и сложностью организации его носителя. В настоящее время, в период мысли (ноогенеза), сознанием на уровне разума обладает человек. В будущем, в период сверхмысли, сознание примет иную форму, отвечающую более сложной структурной организации материи. Дальнейшее развитие сознания Тейяр де Шарден видит в переходе от индивидуализированных в значительной мере мыслящих центров к гармонизированной общности этих центров. "Земля, – пишет он, – не только покрывается мириадами крупинок мысли, но окутывается единой мыслящей оболочкой, образующей функционально одну обширную крупинку мысли в космическом масштабе. Множество индивидуальных мышлений группируется и усиливается в акте одного единодушного мышления" [1. С. 199]. Появление мирового разума как субстанциональной основы индивидуальных душ вызовет стремление к духовному единству, что приведет к объединению людей во всех других отношениях, к образованию нового общества. На этот процесс окажет влияние, причем большее, чем до сих пор, религия, а именно Христианство.

Таким образом, согласно Тейяру де Шардену, эволюция нашей планеты определяется человеческой историей, которая в настоящее время развивается между двумя критическими точками. Одна из них – низшая, означает появление человека с его индивидуализированным рефлекслирующим мышлением и начало перехода биосферы в ноосферу. Другая точка – высшая, отвечает человечеству, достигшему коллективного рефлекслирующего мышления. При этом, полагает Тейяр де Шарден, ноосфера обретает "... одновременно крайнюю степень своей сложности и своей сосредоточенности". Это будет означать "... переворот равновесия, отделение сознания, в конце концов достигшего совершенства, от своей материальной матрицы, чтобы отныне иметь возможность всей своей силой покоиться в Боге-Омеге. ... Под действием все более горячих лучей Омеги прекратятся ненависть и междоусобная борьба, побежденные чувством Земли и человека. Во всей ноосфере будет царить какое-то

единодушие. Завершающая конвергенция произойдет мирно" [1. С. 225–226].

Так, несколько мистически, заканчивает Тейяр де Шарден изложение своего учения об эволюции Земли. Перспективу развития человечества он видел в predetermined гармонизации общества на основе разума и стремлении коллективной мысли к абсолютной свободе, достигаемой при ее слиянии в некоей конечной точке Омеги с Богом. Это будет означать конец времени, завершение твари, победу Бога, возвращение человека в лоно Божье.

Эволюционное учение В.И. Вернадского. Работа Тейяра де Шардена "Феномен человека" [1] была закончена в 1940 г., однако увидела свет лишь через 20 лет, уже после кончины автора. Аналогичная, быть может, даже более печальная судьба была у другого выдающегося философского произведения на ту же тему – труда В.И. Вернадского "Научная мысль как планетное явление", которое автор считал своей "книгой жизни". Она была написана в 1937–1938 гг., а впервые опубликована, да и то в искаженном виде, лишь спустя 40 лет. В полном же объеме книга напечатана в 1988 г. [27]. В обоих случаях препятствием к своевременной публикации послужили чуждые науке идеологические барьеры. П. Тейяр де Шарден, будучи послушным членом ордена иезуитов, оказался не в силах преступить запрет папской курии на печатание своей книги. Труд же Вернадского в течение половины столетия фактически находился под арестом, поскольку власть его страны не обнаружила в нем должного пиетета к официальным мистификациям и идейным фетишам.

Эволюционное учение Вернадского о биосфере и переходе ее в состояние ноосферы опирается исключительно на естественные науки и тем не менее является чисто философским неопозитивистским учением. В отличие от учения Тейяра де Шардена, оно не содержит каких-либо теологических элементов. Биосфера в нем трактуется автором как целостная материальная система, способная к самосовершенствованию своей структурной организации. Живая и неживая природа полностью материальны, происходящие в мире изменения заранее не predetermined, а представляют собой результат действия стихийных природных сил, которые поддаются познанию, имеют естественнонаучное объяснение и могут быть предсказаны. Несмотря на принципиально различные идейные позиции авторов, многие моменты учений обоих достаточно близки. Это касается прежде всего этапов эволюционного процесса Земли, воздействия на биосферу появления вида *Homo sapiens* и антропоцентрического характера трактовки последующего развития планеты. Эволюцию Земли Вернадский представляет как ряд последовательных спонтанно протекающих необратимых процессов. Он выделяет этапы космического, геологического, биогенного и антропогенного развития, каждый раз ориентированного на совершенствование структурной организации Земли. Особенно большое внимание Вернадский уделяет анализу взаимоотношений между биосферой и человечеством.

В.И. Вернадский, как и П. Тейяр де Шарден, считает, что появление на Земле вида *Homo sapiens* кардинальным образом изменило содержание и характер эволюционного процесса. Развитие биосферы, полагает он,

с течением времени все больше стало определяться не дарвиновским стихийным естественным отбором, а целенаправленной созидательной рационалистической деятельностью людей, сознанием человека, возвысившимся до уровня научного мышления. "Научная мысль становится главной движущей силой эволюции, устанавливающей свою власть над биосферой. Эволюционный процесс получает ...особое геологическое значение благодаря тому, что он создал новую геологическую силу – научную – мысль социального человечества ...Под влиянием научной мысли и человеческого труда биосфера переходит в новое состояние – в ноосферу" [27. С. 27]. И еще: "...Мы переживаем сейчас выделение в биосфере царства разума, меняющего коренным образом и ее облик и ее строение, – ноосферы" [27. С. 127]. Ноосфера или, по выражению Вернадского, царство разума, – новая оболочка нашей планеты, создающаяся уже не стихийно, как это имело место в предшествующие геологические эпохи, а сознательно, на научной основе. Структурная организация ноосферной оболочки поддерживается научными знаниями, получаемыми из множества тесно связанных друг с другом научных центров, разбросанных по всей Земле и Космосу. Переход биосферы в новое состояние "...есть стихийный природный процесс, корни которого лежат глубоко и подготавливались эволюционным процессом, длительность которого исчисляется сотнями миллионов лет" [27. С. 28]. "...Этот развивающийся на наших глазах процесс, – заключает Вернадский, – необратим и неизбежен" [27. С. 91].

Таким образом, центральная мысль эволюционного учения В.И. Вернадского сводится к утверждению, что по мере вступления биосферы в состояние, определяемое научной мыслью и организованным трудом, качественно меняется путь эволюционного процесса. Из спонтанно протекающего и, следовательно, никем не управляемого он все больше превращается в сознательный процесс, содержание и ориентация которого детерминируются научной мыслью. Человеческий разум становится творцом возникающего мира. "Перед человечеством, – восклицает Вернадский, – открываются все более и более широкие творческие возможности. И, может быть, поколение моей внучки уже приблизится к их расцвету ...Можно смотреть поэтому на наше будущее уверенно. Оно в наших руках. Мы его не упустим" [27. С. 509–510]. Так непоколебимо и оптимистично заканчивается последняя в жизни Вернадского статья "Несколько слов о ноосфере", опубликованная в 1944 г.

П. Тейяр де Шарден также считал ноосферу плодом человеческого разума и поэтому, как и В.И. Вернадский, имел ничем не замутненное мнение о светлом будущем человечества. Он, как отмечалось выше, принимал человеческую мысль за "центр перспективы эволюции" и "центр конструирования мира" и предсказывал человечеству, наделенному "ноосферной мощностью", неограниченные возможности в целенаправленном развитии. И то и другое учение, несмотря на трансцендентный характер одного и материалистический характер другого, сходились в своем возвышении человека по существу до положения Богочеловека.

Учение Вернадского о всеохватывающем и определяющем влиянии научных знаний на историю нашей планеты, причем влиянии исключительно позитивном, считается в науке одним из фундаментальных фило-

софских и естественнонаучных обобщений. Как писал в 1988 г. биограф ученого И.В. Кузнецов, оно утверждает, что люди "...могут регулировать способы и формы взаимодействия общества с природой. В их власти выбор направления и характер развития этого взаимодействия. Необходимо только, чтобы оно стало под строгий научный контроль, стало предметом специального научного исследования и благодаря этому складывалось бы не стихийно, а сознательно и планомерно" [31. С. 461–462].

Если судить по научной литературе, особенно отечественной, то может создаться впечатление, что философские идеи Вернадского о ноосфере безусловно выдержали проверку временем, получили теоретическое обоснование и экспериментальное подтверждение. Вот что, например, в наши дни пишет об учении Вернадского о переходе биосферы в состояние ноосферы известный антрополог В.П. Алексеев: "...Это не только научная концепция, но и великолепное предвидение будущего могущества человечества, в котором нашло отражение мировоззрение, пронизанное светлым оптимизмом и верой в будущее. С выходом человека в Космос это предвидение блестяще оправдалось, границы ноосферы чрезвычайно расширились, и она превратилась в космическое явление" [32. С. 85]. Подобных оценок философских взглядов Вернадского много. Приведу еще два высказывания, принадлежащие академику А.Л. Яншину и историку естествознания члену-корреспонденту РАН С.Р. Микулинскому. Первый утверждает: "Процесс эволюции биосферы в ноосферу, предсказанный Вернадским, – это качественно новое по самой своей сущности явление в истории планеты, не имеющее даже отдаленных аналогов в прошлом" [33. С. 13]. С высказанной мыслью полностью согласен Микулинский, который писал: "По-настоящему глубокие идеи часто только со временем раскрываются во всем их значении. Но когда это происходит, ни у кого уже не остается сомнений в том, что их творцы намного опередили свое время, смогли заглянуть далеко вперед, видели дальше и глубже своих современников, и влияние их идей сильно возрастает. Именно это произошло со многими идеями В.И. Вернадского и прежде всего с его учением о ноосфере" [34. С. 481].

Непонимание и невосприятие современниками неординарных идей выдающихся ученых часто имело место в прошлом и продолжает, очевидно, иметь место в настоящем. И тем не менее, история науки еще не знает случая, когда хотя бы одному философу или естествоиспытателю удалось исчерпывающим образом охватить свою мыслью все современные ему знания и затем произвести такой их всеобъемлющий синтез, что созданное на этой основе учение оказалось бы спустя много лет справедливым во всех своих, даже самых важных положениях. В связи с чем любое учение, особенно философское, независимо от масштаба гениальности автора, не сможет полностью удовлетворить научному мировоззрению последующих поколений, живущих в иной исторической эпохе и уже в силу этого обладающих мышлением, если и не более высокого ранга, то во всяком случае несколько иным. Следовательно, не только позволительно, но просто необходимо усомниться в абсолютной справедливости учения Вернадского (как и Тейяра де Шардена) и попытаться взглянуть на него с позиции сегодняшних знаний, т.е. иначе, чем это мог делать сам

Вернадский и делают сейчас, подобно только что процитированным авторам, многие. Такая попытка, очевидно, представилась бы своевременной и самому В.И. Вернадскому, поскольку он предсказывал расцвет царства разума в конце XX в. Конечно, речь идет не о конкретном сроке вступления в ноосферу, а о реально наблюдаемой через полстолетия тенденции развития биосферы.

Учение о ноосфере и действительность. Не будет преувеличением сказать, что за последние десятилетия произошли радикальные изменения в естествознании, в мироощущении человека, в его восприятии природы и самого себя, в характере воздействия естественных наук на общечеловеческую культуру. Научные открытия фундаментальной важности, сделанные во второй половине XX столетия, привели к революционным преобразованиям наших представлений об окружающем мире и Космосе, ознаменовали качественно новый этап развития научных знаний. Революция в естествознании не ограничивалась чисто научной и технической сферами деятельности человека. Существенные изменения в этот период произошли также в философской, религиозной, культурной и социально-политической областях, иными словами, во всех сферах духовной жизни людей. Другим стало человечество, по-другому стал выглядеть и восприниматься мир.

В последующем рассмотрении происшедших изменений наибольший интерес будет представлять вопрос о том, каким образом гигантский, дотоле невиданный рост научных знаний, в той или иной мере предвиденный Вернадским и Тейяром де Шарденом, отразился на характере эволюционного процесса в биосфере и на взаимоотношениях человека с живой и неживой природой. Привело ли прогрессивное развитие науки к переходу биосферы в состояние ноосферы, царство разума и мысли, как это представляли оба философа и естествоиспытателя? В какой мере научное мышление стало определять содержание и направление эволюционного процесса? Почувствовал ли себя человек с расцветом науки более комфортно и свободно? Стал ли он, действительно, хозяином своего настоящего и будущего? Положительные ответы на эти и другие, аналогичные по смыслу, вопросы означали бы безусловное признание основного положения учения Вернадского о примате научных знаний над естественной эволюцией – его постулата о принципиальной возможности человеческого разума руководить развитием биосферы, управлять множеством одновременно происходящих явлений в обществе и окружающем нас мире.

Достижения естественных наук предоставили людям огромные возможности в разумном управлении и хозяйственном использовании природы. Научные успехи, многие из которых поражают воображение, казалось бы, дают основание говорить если не о повсеместном решительном вступлении биосферы в состояние ноосферы, то, по крайней мере, о тенденции развития в этом направлении. Но тогда почему человечество оказалось сегодня в ситуации, близкой к трагической? Почему людей, особенно ученых, во всем мире охватила тревога, имеющая глобально апокалипсический характер, за судьбу человечества, его ближайшее будущее? Ничего подобного эволюционные учения Вернадского и Тейяра де Шардена не предсказывали.

Учение Тейяра де Шардена связывает наступление ноосферы с исключительностью человека, его способностью обретать совершенное сознание, отделяющееся от материи и сливающееся с Богом. Трансцендентный характер учения исключает постановку вопроса о научном доказательстве его справедливости. П. Тейяру де Шардену можно верить или не верить. Иное дело, учение Вернадского, не содержащее трансцендентных элементов. Оно представляет переход биосферы в ноосферу как естественный, самопроизвольно протекающий процесс, подчиняющийся законам материального мира и поддающийся научному познанию. Поэтому ниже речь пойдет, главным образом, об учении Вернадского, его соответствии сегодняшним реалиям и уровню естественнонаучных знаний.

Научный прогресс, вольно или невольно, но в конечном счете именно он, затронув во второй половине XX в. жизненные интересы всех людей чрезвычайно парадоксальным, двойственным образом и привел к невероятному обострению давно накапливавшихся противоречий между человечеством и остальной частью биосферы. Наука, создавшая непомерную промышленно-техническую и военную мощь, в то же время сделала очевидной смертельную для всего вида *Homo sapiens* опасность произошедшего вторжения человека в процессы, ранее протекавшие в биосфере стихийно.

Вне всяких сомнений можно констатировать, что многократное за последние 60 лет увеличение объема научных знаний, их качественный рост и совершенствование научного мировоззрения не привели к становлению ноосферы. В настоящее время уже нельзя не видеть, что развитие науки и эволюция биосферы шли в противоположных направлениях, что привело к возникновению совершенно новой, ставшей для человечества самой актуальной проблемы – собственного выживания. Вместо обещанного Вернадским и Тейяром де Шарденом сознательного управления эволюционными процессами – продолжающееся сползание человечества к экологической катастрофе. Вопрос состоит уже не в том, больна или не больна планета, а в том, возможно ли ее выздоровление или она больна смертельно. Вот как оценивает сложившуюся ситуацию отец Александр Мень: «...Подлинно новое наших дней ужаснет историю ...Нигилисты прошлого века глумились над Апокалипсисом, называя его "Произведением сумасшедшего". Могли ли они предполагать, что эпоху, которую они так ждали, придется описывать терминами этой провидческой книги» [35. С. 139]. По существу тот же смысл содержит высказывание И. Пригожина и И. Стенгерса: "Мы живем в опасном и неопределенном мире, внушающем не чувство слепой уверенности, а лишь ...чувство умеренной надежды..." [22. С. 386]. А вот как воспринимает действительность А.И. Солженицын: "Мы так заклинили мир, так подвели его к самоистреблению, что подкатило нам под горло самое время каяться... если не переменимся мы с нашим истребительно-жадным прогрессом, то при всех вариантах развития в XXI в. человечество погибнет от истощения, бесплодия и замусоренной планеты" [36. С. 13].

Итак, действительность категорически противоречит утверждениям Вернадского и Тейяра де Шардена о вступлении биосферы в ноосферу. Человеческий разум не овладел общей ситуацией на Земле; эволюцион-

ный процесс, по-прежнему никем не управляемый, все стремительнее развивается в неблагоприятном для человечества направлении. Негативные последствия противоприродной деятельности и недостаточно продуманного вмешательства людей в естественные процессы – это ответные реакции биосферы, ее предупреждение о том, как не следует поступать, своего рода уроки, на которых природа "пытается учить" человечество правилам "хорошего тона". Люди, однако, слабо реагируют на грозные предостережения и не отдают себе отчета в том, что "победа" над биосферой хуже всякого поражения от нее.

Экологические безумства стали возможны благодаря научным знаниям. Совершаются же они вопреки им, под действием более могущественных в настоящее время экономических и социально-политических сил, а то и просто глупости, лени, алчности и безответственности. Однако предположим, что в будущем, после решения многих социальных и национальных проблем, а также значительного повышения культурного и общеобразовательного уровня людей негативные факторы такого рода перестанут играть определяющую роль, и научные рекомендации повсеместно станут руководящим принципом. Произойдет ли в этом случае переход биосферы в ноосферу? Возможно ли в принципе рациональное управление эволюцией? Попытка ответить на эти вопросы сделана в следующем разделе. Сейчас, забегая несколько вперед, отметим, что состояние ноосферы, как себе его представляли Вернадский и Тейяр де Шарден, недостижимо по крайней мере по следующим трем причинам принципиального характера. Во-первых, и что самое главное, из-за случайности и непредсказуемости протекающих в биосфере эволюционных процессов. Во-вторых, из-за неизбежной ограниченности научных знаний, исключающей предвидение стратегического развития природы и общества. В-третьих, вследствие некорректности самой постановки и нереальности решения задачи завоевания научным мышлением господствующего положения среди других форм духовной жизни.

Несостоятельность эволюционного учения Вернадского заключена в его главной идее, допускающей возможность детерминистического развития биосферы, продиктованного научным мышлением. Антропоцентризм учения возносит человека над миром, наделяет его способностью предусматривать будущее развитие природы и общества, выбирать направление эволюции и управлять всем ходом этого процесса. "Человеку внушается, – писал С. Булгаков в самом начале XX в. о рационалистическом мировоззрении, – что он есть высшее в мире, что он автономен, что он прекрасен, что он разумен, самодовлеющ, что он Бог, если не в единичности и обособленности, то в своем целом, вместе с другими" [37. С. 50].

Эволюционное учение Вернадского, как и Тейяра де Шардена, о ноосфере, царстве разума, столь же утопично, как и учение о построении коммунистического общества ("земного рая"), декларирующее наступление той же эпохи ноосферы, но не во всей биосфере, а в социально-экономической области. В утверждениях Вернадского "о постоянном стремлении человеческой мысли покорить себе факты совершенно стихийного на вид характера" и о "постоянной борьбе сознательных укладов жизни против бессознательного строя законов природы" [27. С. 499], наверное,

следует скорее видеть недостаточную зрелость человеческой мысли, чем проявление "мощи научного знания" или действие "геологической силы свободно мыслящего человечества".

Познаваемость мира. Взаимодействие науки с философией, религией, искусством и этикой, взаимодействие сознания с экономикой и политикой, наконец, взаимодействие всего перечисленного с окружающим миром столь множественны, сложны, неоднозначны и многовариантны, что попытка создать научную модель гармонического развития человечества и биосферы представляется безнадежным занятием, что и подтверждается сегодняшней практикой. До недавнего времени, однако, полагали, что трудности не носят принципиального характера, а обусловлены неполнотой наших знаний и математической или технической сложностью моделирования. Еще Гёте в начале XIX в. писал: "Естествознание так ясно доказывает, что самое великое, самое таинственное, самое волшебное протекает необыкновенно просто, открыто и без всякой магии ...Письмена природы велики и прекрасны ...Пусть мир лежит перед нами безначальный и бесконечный, пусть будет безгранична даль, непроницаема близь; все это так, и все же – пусть никогда не определяют и не ограничивают, насколько далеко и насколько глубоко способен человеческий ум проникнуть в свои тайны и тайны мира" (цит. по: [38. С. 117]). По прошествии ста лет в самом начале XX в. С. Булгаков писал о познаваемости мира более осторожно: "Задачи и значение науки вполне относительно и ограничены. Она имеет дело с определенным (логически и философски) кругом проблем опытного (в кантовском смысле) знания, причем она способна к бесконечному прогрессу по самой своей идее; горизонт постоянно отходит перед нею, новое знание раздвигает шире область незнания, но остров знания по-прежнему окружен морем тайн и вечности" [37. С. 15].

Причина относительности и ограниченности научных знаний, однако, не только, да и не столько, в том, что "нельзя объять необъятное". К мысли о невозможности научного предвидения эволюции природы и общества подвело развитие самой науки, причем такой строгой, как физика. Выше было отмечено, что научное познание, являясь нелинейным неравновесным процессом, именно "по самой своей идее" оказывается неспособным стремиться к предсказываемому "бесконечному прогрессу". Ограниченность знаний есть не относительное, а органическое, имманентное свойство науки, проявляющееся всякий раз по отношению к вновь возникающим явлениям, совершающимся не по причинно-следственному, а по случайно-поисковому механизму. "И на макроскопическом, и на микроскопическом уровнях, – считают И. Пригожин и И. Стенгерс, – естественные науки отказались от такой концепции объективной реальности, из которой следовала необходимость отказа от новизны и многообразия во имя вечных и неизменных универсальных законов. Естественные науки избавились от слепой веры в рациональное как нечто замкнутое и отказались от идеала достижимости окончательного знания, казавшегося почти достигнутым. Ныне естественные науки открыты для всего неожиданного, которое больше не рассматривается как результат несовершенства знания или недостаточного контроля" [22. С. 378–379].

Высказывание И. Пригожина и И. Стенгерса, правильное в отношении своей основной идеи, следует, однако, уточнить. Отказ от концепции вечных и универсальных законов затрагивает явления лишь одной из рассмотренных выше трех групп, а именно статистико-детерминистические, т.е. тех, посредством которых осуществляется эволюция биосферы и совершенствование научного мышления. Следовательно, человечество не в состоянии прогнозировать неподвластное ему будущее биосферы и неспособно прогнозировать развитие науки и строить неведомое царство разума. Достигнутый к настоящему времени уровень естественнонаучных знаний и приобретенный опыт, по-видимому, вполне достаточны для понимания необоснованности, более того, опасности любых претензий научного мышления на руководство ходом эволюции и верховенство над остальными видами духовной жизни человека.

В развитии природы и общества можно выделить кумулятивные и эволюционные составляющие, отвечающие соответственно количественным и качественным изменениям. Кумулятивное развитие определяется явлениями первых двух групп, о которых было уже упомянуто выше. Это чисто детерминистические и чисто статистические явления. К ним также следует отнести те статистико-детерминистические явления третьей группы, которые совершаются не в первый раз. В этом случае не происходит возникновения новых более сложных и совершенных структурных организаций, т.е. отсутствуют качественные изменения систем, и развитие является кумулятивным. Когда такие явления известны, нет принципиальных препятствий для их экспериментального и теоретического изучения, моделирования и предсказания. Кумулятивное развитие, однако, не бывает вечным. Рано или поздно, но непременно и почти всегда неожиданно, кумулятивный процесс обрывается. Один из механизмов дальнейшего развития событий может заключаться в потере системой устойчивости из-за разрыва старых связей и наступления хаоса, из которого спонтанно возникает неведомый ранее новый порядок. Это эволюционный, качественно новый этап развития системы. Априори предсказать, когда он возникнет, как будет протекать и чем закончится, не представляется возможным точно так же, как нельзя предсказать траекторию броуновского движения коллоидной частицы. Эволюционный этап порождает новую структурную организацию, наделенную неизвестными ранее свойствами. В физике, например, эволюционное развитие, имевшее место на рубеже XIX–XX вв., привело к возникновению квантовой механики.

Решение вопроса о возможности создания на научной основе стратегической программы направленного эволюционного развития биосферы оказалось тесно связанным с проблемой случайности и необходимости. В изучении статистико-детерминистических явлений эта проблема приобретает, как показал Пригожин, принципиально новое и важное значение. Выше отмечалось, что явления такого типа возникают только в системах, находящихся в сильно неравновесном состоянии, чрезвычайно чувствительном к внешним воздействиям. Вдали от положения равновесия на первый план выступают нелинейные соотношения, и слабый сигнал на входе в систему может приводить к сильнейшему и, что особенно важно, совершенно неожиданному эффекту. Это происходит в точке бифуркации,

где взаимодействия с окружающей средой спонтанно переводят открытую систему в критическое состояние, в котором случайно возникшее сочетание вполне определенных необратимых флуктуаций вызывает непредсказуемый переход системы от менее совершенной структурной организации к более совершенной. Еще раз подчеркнем, что система переходит на новый (один из многих) путь развития случайно и самопроизвольно. Вслед за точкой бифуркации, вплоть до столь же неожиданного возникновения новой бифуркации, следует этап кумулятивного, предсказуемого развития. Случайность и необходимость выступают в явлениях такого типа не как взаимоисключающие друг друга противоположности, а как взаимодополняющие альтернативы.

Таким образом, неизбежен вывод о невозможности предсказания хода эволюционного процесса биосферы, поскольку составляющие этот процесс впервые возникающие статистико-детерминистические явления включают элементы случайности. Поэтому учение Вернадского, как и учение Тейяра де Шардена, о переходе биосферы в ноосферу, царство разума, где естественная эволюция будет заменена сознательно планируемым развитием, несостоятельна в принципе, а не в силу неполноты научных знаний. Все вопросы, касающиеся предсказания эволюционных явлений, направленности стратегического развития биосферы, человечества, общества и даже отдельной личности, не могут быть отнесены к научной проблематике, поскольку и эволюция биосферы, и развитие научного познания являются нелинейными неравновесными процессами, совершающимися по беспорядочно-поисковому механизму вдали от положения равновесия, где воздействие случайного фактора, каким бы незначительным он не казался, может оказаться чрезвычайно большим.

Ход эволюционного процесса на Земле непредсказуем и неуправляем человеком еще по одной объективной причине, имеющей вселенское значение. Наша планета как подсистема входит в космическую систему мироздания, солнечную систему. Эффективное воздействие на нее многочисленных физических факторов внешней среды и привело к возникновению жизни и повлияло на всю последующую эволюцию биосферы. А.Л. Чижевский пришел к выводу, что излучения "связывают наружные части Земли непосредственно с космической средой, роднят ее с нею, постоянно взаимодействуют с нею, а потому и наружный лик Земли, и жизнь, наполняющая его, являются результатом творческого воздействия космических сил. А потому и строение земной оболочки, ее физико-химия и биосфера являются проявлением строения и механики Вселенной" [39. С. 26]. Более того: "Быть может, и эрцитивная деятельность на Солнце, и биологические явления на Земле суть соэффекты одной общей причины – великой электромагнитной жизни Вселенной. Эта жизнь имеет свой пульс, свои периоды и ритмы" [39. С. 30]. Действительно, Солнце находится так близко от Земли, всего на расстоянии, равном 107 своих диаметров.

Исследования Чижевского стимулировали такое изменение во взглядах на жизнь, которое по своей сути близко ломке геоцентрических воззрений, начатой в XVI в. Коперником. Данные Чижевского и его последователей требуют замены привычных и широко распространенных в науке гео-

центрических и, как в случае эволюционных учений, антропоцентрических представлений, недооценивающих или даже игнорирующих влияние мирового пространства на структурную организацию биосферы и повседневные земные события, на гелиоцентрическую картину мироздания, в которой Земля и человек лишены ореола исключительности. На фоне этой картины претензия человеческой мысли на руководство ходом эволюционного процесса выглядит особенно курьезной. В этом случае человеку надо возвыситься не только над Землей, а над всей Вселенной.

Таким образом, человечество не всесильно. Оно не в состоянии прогнозировать неподвластное и неизвестное ему будущее биосферы и строить неведомое царство разума. Достигнутый уровень естественнонаучных знаний и приобретенный опыт должны оказаться достаточными для понимания необоснованности и опасности любых претензий научного мышления на руководство ходом эволюции. Обсуждая, правда, не естественнонаучные, а экономико-социальные проблемы, что в данном случае не имеет значения, Ф. Хайек пишет: "Оглядываясь назад, мы можем понять смысл событий, случившихся в прошлом, и увидеть, какие последствия они за собой повлекли. Но история, происходящая у нас на глазах, для нас не история. Она ведет нас в неведомые края, и лишь изредка мы можем на мгновение увидеть, что лежит впереди. Дело обстоит бы по-другому, если бы нам дано было пережить те же события вторично, обладая полным знанием того, что мы уже пережили. Насколько иным все бы предстало перед нами, какими важными, а зачастую и тревожными показались бы едва заметные сейчас сдвиги" [40. С. 178].

Научное мышление не может иметь глобальной цели и стратегического направления своего развития. Назначение фундаментальной науки – следовать за уже совершившимися событиями и изучать актуальные факты и явления. Вл.С. Соловьев уже в конце прошлого века, отмечая "наивное поклонение мнимому царству науки", говорил, что наука "на самом деле познает только то, что бывает, а не творит то, что должно быть" [5. С. 164]. В отличие от мира существующего, мир возникающий, потенциальный, непознаваем. Мудрость человечества не в стремлении подчинить себе природу и продиктовать ей будущее развитие. Мудрость в осознании через научное познание неустойчивого мира его реалий, своей сущности и своих возможностей, в предоставлении свободы развития личности, естественном включении своей жизни в стихию эволюции планеты, стремлении к внутренней и внешней, духовной и материальной гармонии.

В эволюционных учениях Вернадского и Тейяра де Шардена о ноосфере по существу игнорируются все духовные потребности людей за исключением научного мышления, склонность к которому обнаруживают лишь очень немногие. Ему отдается не только безусловный примат над другими сферами человеческого сознания, но и приписывается роль геологической силы как единственно руководящего и направляющего начала эволюции биосферы. Это роднит учение о царстве разума с экономическим учением К. Маркса, в котором из сложнейшего комплекса отношений людей друг с другом и окружающим миром исключительное и доминирующее значение в развитии общества отводится лишь одному

фактору – социально-экономическим отношениям, причем неправильно трактуемым.

Выше была сделана попытка обосновать несостоятельность основополагающих положений учения о ноосфере случайным характером и принципиальной непредсказуемостью эволюционных процессов, а также неизбежной ограниченностью научных знаний. Сейчас обратим внимание на неправомочность и даже опасность провозглашения самой идеи о все-силнии науки. Тезис об исключительном значении для эволюции биосферы научного мышления и научного прогресса включает в себя в неявном виде две мысли, в принципе неприемлемые для гармонического развития как отдельного человека, так и общества. Первая мысль связана со специфической научного творчества, которое, как и любой другой талант, есть редкий природный дар. Ориентировочно можно считать, что из миллионов людей не более десяти человек предрасположены к занятиям чистой наукой, т.е. могут испытывать счастье и добровольно переносить муки научного творчества при поиске истины ради ее самой. Следовательно, чуть ли не все общество не имеет прямого отношения к науке, а подавляющая часть наукой вообще не интересуется и не стремится получить о ней хотя бы элементарное представление. Сознание многих, их мировоззрение и мировосприятие, по существу, остается вне воздействия научных знаний, вне интенсивно развивающегося и постоянно убыстряющегося процесса научного познания. Подавляющее большинство людей является потребителями утилизированных отходов творчества истинных ученых. Имеет место разрыв, склонный к увеличению, между эффективностью развития самой науки и эффективностью ее облагораживающего влияния на духовное состояние общества.

С другой стороны, богатство общества и материальное положение его членов напрямую связаны с научным прогрессом. И здесь благосостояние соответствует росту научных знаний. В результате возникает противоречие между бытовыми условиями жизни, улучшающимися с развитием науки, и духовными запросами людей, остающимися на прежнем уровне или даже деградирующими. Как показывает жизнь, экономический прогресс в современных высокоразвитых демократических обществах, обусловленный развитием науки, не сопровождается заметным расцветом личностных духовных качеств людей, их индивидуальностей. Скорее наблюдается обратная картина, что проявляется в устойчивом снижении культурных запросов, стремлении к избыточной комфортности, падении морально-этических норм поведения, разобщенности людей, росте преступности, наркомании и т.п. К.Э. Циолковский говорил: "Не признаю я технологического прогресса, если он превосходит прогресс нравственный, если физика и химия не служат, а подчиняют себе медицину, как не признаю много другого. Для человечества нужна не техника, а моральный прогресс и здоровье" (цит. по: [41. С. 208]). О духовном оскудении людей свидетельствует также отсутствие бережного отношения к природе, чему способствует и антропоцентрическая пропаганда. В борьбе двух начал – духовного и плотского, если она и ведется, победу, как правило, одерживает последнее. Экономический прогресс, постоянно подстегиваемый наукой, при неадекватном умственном развитии общества увеличивает

бездну, в которую засасывается человечество. Если не изменить существующую тенденцию обеднения духовной жизни людей с помощью образования, как светского, так и религиозного, философского, и приобщения к истинной, а не так называемой массовой культуре, то рано или поздно разрыв достигнет критической точки, и возникнет бифуркация с тяжелейшими последствиями для человечества. Выход не в установлении господства над биосферой, а в собственном преобразовании, создании культа высокообразованного человека, в котором бы гармонично сочетались естественнонаучные знания с гуманитарными и религиозными.

Вторая мысль о негативном влиянии развития науки связана с ее подчиненным положением в современном обществе. Долгое время поиск научных истин мало волновал общество и практически не оказывал влияния на экономику. Вплоть до XVII в. наука заметно не сказывалась и на развитии духовной жизни общества, во всяком случае ее воздействие на умы людей было значительно менее ощутимо по сравнению с поэзией, литературой, музыкой, архитектурой и живописью, не говоря уже о религии и философии. Перелом впервые обозначился на рубеже XVII–XVIII вв. после формирования первого в истории научного мировоззрения, когда стала очевидной огромная потенция, заключенная в науке для развития общества. С этого времени начала наклонно расти необходимость в научной информации. Жажда научных знаний становится перманентным состоянием развивающегося общества. С этого же момента творцы науки начинают терять власть над своим детищем. Помимо чистой науки возникает прикладная наука, наука ради пользы, чаще всего материальной. В принципе это естественно. Плохо, однако, то, что последняя становится критерием научных успехов, а часто и стимулом постановки фундаментальных исследований, т.е. превращается в цель. Между тем, "...никакая мысль, – отмечает К.А. Тимирязев, – не может принести столько вреда успехам умственным и материальным, как убеждение, будто наука в своем поступательном движении должна руководствоваться утилитарными целями ...В действительности же наука может развиваться только строго последовательно, переходя от простого к сложному, и никакой гнет самых настоятельных потребностей не может заставить научную мысль двигаться капризными, случайными скачками, а не идти вперед строго логическим, единственно возможным путем" [10. С. 241].

Направление и масштаб использования научных знаний в настоящее время в огромной степени определяются уже не самими учеными, престиж которых падает. Все чаще возникают абсурдные и опасные ситуации, когда талант и труд многих ученых используются не во благо, а во вред человечеству, его настоящему и будущему. В результате обещаний переход биосферы в состояние ноосферы обернулся своей противоположностью – возникновением проблемы выживания вида *Homo sapiens*.

Концепции развития живой и неживой природы. В середине XIX в. перед наукой встала интригующая своей парадоксальностью проблема, которая оказала сильное влияние на последующую историю естествознания. В физике и биологии почти одновременно были сформулированы две эволюционные концепции, которые утверждали противоположную

направленность развития мира и как бы взаимоисключали друг друга. В физике идея эволюции была провозглашена Р. Клаузиусом в 1850 г. посредством второго начала термодинамики – закона необратимого возрастания энтропии в изолированных системах. Л. Больцман, установив связь между энтропией и вероятностью состояния, дал второму началу статистическое объяснение, согласно которому необратимость обусловлена стохастическим характером и спонтанной эволюцией макроскопических систем к наиболее вероятному, отвечающему максимальному беспорядку, состоянию. Спустя столетие после возникновения равновесной термодинамики в 1954 г. Н. Винер пишет: "По мере того как возрастает энтропия, Вселенная и все замкнутые системы во Вселенной естественно имеют тенденцию к изнашиванию и потере своей определенности и стремятся от наименее вероятного состояния к более вероятному ... состоянию хаоса и единообразия" [42. С. 27–28]. П. Гленсдорф и И. Пригожин эту же мысль облекли в предельно краткую и выразительную форму: "Классическая термодинамика есть в сущности теория разрушения структур, а производство энтропии можно рассматривать как меру скорости этого разрушения" [43. С. 9].

Установление второго начала термодинамики и введение понятия о необратимости самопроизвольно протекающих процессов качественно изменили научное представление о времени. Обнаружилось неведомое для классической физики (а позднее квантовой механики) его свойство – направленность, критерием которой для процессов в изолированных системах служит изменение энтропии, названное в связи с этим А. Эддингтоном "стрелой времени" [23. С. 68]. Теория деградации структур, выравнивания свойств всех составляющих системы во всех возможных отношениях не может естественным образом описать феномен жизни, ее возникновение, усложнение и совершенствование. Перенесение этой концепции на мир в целом ведет, с одной стороны, к идеям креационизма и катастрофизма Ж. Кювье, а с другой – к идее У. Томпсона и Р. Клаузиуса о "тепловой смерти", в конечном счете к теологическим воззрениям на сотворение и конец мироздания.

Эволюционная концепция, провозглашенная Ч. Дарвином в 1859 г. в биологии, утверждала диаметрально противоположное направление развития. В ней говорилось не о разрушении структур, а, напротив, об их возникновении, прогрессирующем усложнении, разнообразии и совершенствовании путем расхождения (дивергенции) видовых признаков и свойств живых организмов. Исторический переход от низших биосистем к биосистемам с более высокой структурной организацией происходит, согласно Дарвину, за счет ненаправленных изменений, вызываемых случайными отклонениями исходных форм, подпавших под действие естественного отбора.

Таким образом, физическая концепция развития утверждала, что самопроизвольно протекающие процессы должны непременно сопровождаться хаотизацией системы, и продуктом свободы может быть только еще большая свобода. Биологическая же концепция декларировала возможность спонтанного возникновения порядка из хаоса. Продуктом свободы здесь является необходимость.

Эволюционные концепции в физике и биологии базировались на огромном опытном материале. Но так как между физическими и биологическими экспериментами долгое время не находили прямых связей, и одна концепция касалась явлений только неорганического мира, а другая – только мира растений и животных, утвердилось представление, имевшее до середины XX в. повсеместное распространение, о несовместимости законов физики и биологии, особой сущности живой природы. Эволюционные процессы самоорганизации биосистем, не обнаруживаемые в неживых системах и не находившие естественнонаучного объяснения, представлялись загадочными и поражали воображение ученых и философов. Через 50 лет после выхода в свет "Происхождения видов" Ч. Дарвина С. Булгаков писал: «Теория эволюции вводит нас, сама того не замечая, в мир чудес, в мир нового непрерывного творения, в мир постоянных преобразований. Теория эволюции устанавливает лишь порядок становления нового создания, и, описывая эти условия, она делает нас нечувствительными к тому, что мы живем в атмосфере непрерывного чуда. Разве не чудо, не новое творение – появление жизни на нашей планете, новых видов, наконец, культуры?... Центр вопроса состоит именно в том, где же искать мирового демиурга, творящего эту "естественную необходимость"?» [37. С. 50].

Одни искали "мирового демиурга" в вещественном мире, другие, их было большинство, в мире трансцендентном, находящемся за пределами опыта. Первые пытались воссоздать, как им казалось, на материальной и чисто научной основе целостную картину живой и неживой природы, выявить и изучить связи между биологическими и физическими явлениями и тем самым устранить противоречивость двух эволюционных теорий. Вторые, не находя или не пытаясь искать самостоятельного пути и полагая, что на вещественной основе это сделать принципиально невозможно, объясняли эволюцию и особенности биосистем не материальными причинами, имманентными свойствами материи, а действием духовного начала. Впервые последовательное виталистическое представление было развито еще Аристотелем (IV в. до н.э.) в учении об энтелехии как о душе, определяющей форму, развитие и назначение первоматери, которая сама по себе пассивна и лишь потенциально одарена жизнью. Философы и естествоиспытатели, придерживающиеся материалистических позиций, объясняли различия между живым и неживым существованием разных форм движения материи – биологической, в первом случае, и механической, физической и химической – во втором. Считалось, что формы находятся в иерархической субординации: высшие качественно отличаются от низших и не сводятся к ним. Бытующее и сейчас учение о формах движения материи [44, 45] по своему уровню соответствует натурфилософскому, достойному античных времен, воззрению. Оно не опирается на опытные факты и по существу представляет собой простую декларацию, своего рода "материалистический" вариант витализма.

Сторонники той и другой концепции восприятия мира связывали специфику живой природы с присущей только ей особой активной формой материи, склонной к самовоспроизведению, усложнению и совершенствованию. Трактовки же этой формы отражали лишь символы веры и ничего не добавляли к констатации самого факта отличия живого от неживого, не

вносили ничего нового ни в физику, ни в биологию. Такая ситуация сохранялась в принципе неизменной с момента постановки проблемы о специфике живого (впервые это было сделано еще античными мыслителями ионийской школы) до конца 70-х годов XX в. Отсутствие прогресса не было случайностью, а указывало на существование в течение 2,5 тыс. лет разрыва между постановкой проблемы и возможностями ее научного решения. Все это долгое время она не могла быть сформулирована в корректной для естествознания форме и поэтому оставалась теософской, философской или натурфилософской проблемой, но не естественнонаучной. Только в середине второй половины XX в. совокупные возможности физики, химии и биологии оказались адекватными сложности проблемы.

Структурная организация биосистем молекулярного уровня. Дж. Холдейн в 1935 г. утверждал: "Активное поддержание нормальной и притом специфической структуры и есть то, что мы называем жизнью; понять сущность этого процесса – значит понять, что такое жизнь" [46. С. 24]. В решении проблемы об особой структурной организации живого и установлении элементарного уровня этой организации определяющую роль, как и в решении многих других проблем, в частности рассмотренных в предшествующих разделах, играют два, уже не раз отмечавшихся события. Одно из них – становление молекулярной биологии, которая сделала возможным постановку проблемы применительно к простейшей и самой фундаментальной биологической системе (молекулярной). Второе событие – создание теоретических основ изучения неравновесных процессов, спонтанно протекающих в открытых системах вдали от положения равновесия. Появление нелинейной неравновесной термодинамики сняло казавшееся принципиальным противоречие с вопроса о противоположной направленности физической и биологической эволюционных концепций и открыло путь к строгому описанию конкретных механизмов самопроизвольного возникновения порядка из хаоса. Было доказано, что основные положения этой области знаний справедливы для трактовки процессов самоорганизации, протекающих как в биологических системах, так и в открытых неорганических системах, физических и химических.

Ответственными за свойства соединений являются структурные организации молекул. "Поскольку окружающий нас мир никем не построен, – полагают И. Пригожин и И. Стенгерс, – перед нами возникает необходимость дать такое описание его мельчайших "кирпичиков" (т.е. микроскопической структуры мира), которое объяснило бы процесс самосборки" [22. С. 47]. Следовательно, наличие у так называемой живой материи специфических черт следует ожидать уже в организации биологических молекул. Если специфика живой материи, действительно, проявляется не только в комбинации определенного набора соединений (что очевидно), но и в особом, отсутствующем у неорганических веществ качестве биологических молекул (что не очевидно), то проблема живого и неживого трансформируется в проблему структурной организации молекул одушевленной и неодушевленной природы. Такая формулировка, однако, страдает неопределенностью, поскольку понятия "живая и неживая материя", "мельчайшие кирпичики" и им подобные лишены необходимой конкретности и скорее могут быть отнесены к собирательным, фило-

софским, нежели научным, категориям. Проблему структурной организации биологических молекул целесообразно разделить на две части — внутреннюю и внешнюю, и рассматривать их раздельно. В первой, внутренней части, речь идет о соединениях, синтезируемых в клетках микроорганизмов, растений и животных, и поиске ответов на вопросы о том, в чем состоит специфика молекулярной структурной организации биологических объектов, все ли они наделены ею и в какой степени. Во второй части после выявления соединений, в которых специфическая организация представлена наиболее ярко, проблема получает окончательное решение при сопоставлении молекулярных свойств типичных представителей биологических и неорганических систем.

Среди многочисленных компонентов биосистем молекулярного уровня исключительная роль в процессах жизнедеятельности, бесспорно, принадлежит белкам. Активно участвуя практически во всех протекающих в клетках и организме процессах, они наделены поистине универсальными биофизическими и биохимическими свойствами. Белки обладают способностью к взаимному превращению всех необходимых для жизни видов энергии: тепловой, механической, химической, электрической и световой. Кроме того, они входят в состав соединительных и костных тканей, кожи, волос и других структурных элементов всех уровней живого организма, выполняя динамическую опорную функцию и обеспечивая нежесткую взаимосвязь органов, их механическую целостность и защиту. Нет смысла перечислять все функции белков, спектр их действия огромен. Отметим лишь, что по разнообразию своих физических и химических проявлений белки несопоставимы с возможностями любого другого класса соединений живой и неживой природы. Они "умеют" делать все, и именно поэтому назначение генетического аппарата любого живого организма сведено к хранению информации только о белках и к их синтезу. Биосистемы всех уровней, в том числе и молекулярного, можно считать "произведениями" белков. При функциональной универсальности природных аминокислотных последовательностей деятельность каждого отдельного представителя этого класса уникальна в отношении функции, механизма действия, природы лиганда и внешней среды. И, наконец, белки проявляют высочайшую активность в физиологических, мягких условиях и не образуют при своем функционировании побочных продуктов.

Ничем подобным, как по ширине функционального спектра, так и специфичности и эффективности реализации любой функции этого спектра, не обладает ни один класс искусственных, синтезированных человеком соединений. Таким образом, из всего того, что составляет молекулярный уровень биосистем, только белки (или прежде всего белки) могут быть ответственны за фундаментальные особенности живого — великое разнообразие органического мира, избирательность и эффективность процессов жизнедеятельности, наличие активного начала и удивительной целесообразности в организации живой материи. Количество различных белков, участвующих в функционировании организма, определяет его морфологическую и физиологическую сложность, а следовательно, и положение в иерархической организации живой природы. Чем же могут быть обусловлены столь необычные как по своему характеру, так и разно-

образию свойства белковых молекул, представляющие собой исторические объекты, возникшие и изменяющиеся в процессе эволюционного развития?

Прежде всего, белки уникальны в отношении химического строения. Это гетерогенные нерегулярные полипептидные последовательности 20 α -аминокислот и их производных, включающих самые разнообразные по своим химическим и физическим свойствам, т.е. валентным и невалентным взаимодействиям, атомные группы. В химическом построении белковых молекул уже можно усмотреть огромные потенциальные возможности к вариации физико-химических свойств. И в то же время белки представляют собой фактически единственный класс соединений, химические свойства которых нельзя непосредственно соотнести с химическим строением молекул. Поведение белков всецело определяется исключительной, присущей только им пространственной структурной организацией. Лишаясь ее, белки теряют все свои биологические свойства. За редким исключением, лишь белковые цепи способны самопроизвольно свертываться в строго детерминированные структуры, геометрия и конформационная динамика которых в физиологических (нативных) условиях полностью определяются аминокислотной последовательностью. Трехмерные структуры белков индивидуализированы, очень сложны и имеют строгий порядок, не сводящийся, однако, к периодичности. Способность природной полипептидной цепи к пространственной самоорганизации и обретению определенной молекулярной структуры – самая яркая особенность белков, отсутствующая у молекул искусственных полимеров, в том числе у полученных человеком поли- α -аминокислот. В растворе синтетический полимер находится в состоянии статистического клубка, флуктуации которого могут приводить к появлению в цепи регулярных участков лишь ближнего порядка. При этом, однако, ни при каких условиях не образуются стабильные трехмерные структуры, тем более идентичные для всех молекул данного полимера. В твердом виде синтетический полимер пребывает в аморфном состоянии, которое может включать частично кристаллическую фазу из беспорядочно ориентированных друг относительно друга зародышевых микрокристаллических областей. Искусственные полимеры отличаются качественно и по своим химическим свойствам, которые в той или иной мере воспроизводят свойства соответствующего мономера и могут быть описаны ограниченным набором реакций, специфичных для повторяющегося звена в свободном состоянии.

В отношении строгой, с точностью до тепловых флуктуаций, детерминированности пространственной структуры и высокой плотности упаковки атомов белковые молекулы (но не белковые кристаллы) сближаются с кристаллами низкомолекулярных соединений, хотя последние однородны и периодичны, а первые неоднородны и аperiодичны. Но и здесь различия велики. Э. Шредингер следующим образом оценивает дистанцию между периодическим и аperiодическим кристаллическими состояниями малых неорганических молекул и органических макромолекул: "Для физики периодические кристаллы являются весьма интересными и сложными объектами; они составляют одну из наиболее очаровательных и сложных структур, которыми неодушевленная природа приводит в заме-

шательство интеллект физика. Однако по сравнению с аperiodическими кристаллами они кажутся несколько элементарными и скучными. Различие в структуре здесь такое же, как между обычными обоями, на которых один и тот же рисунок повторяется с правильной периодичностью, и шедвром вышивки, скажем, рафаэлевским гобеленом, который воспроизводит сложный, полный замысла рисунок, начертанный великим мастером" [47. С. 15].

Существенно различны между собой не только конечные результаты процесса структурной самоорганизации белковых молекул и обычных кристаллов, но и механизмы этого процесса, о чем подробно рассказывается в главе 1. Отметим лишь, что образование кристаллов низкомолекулярных соединений в насыщенных растворах может быть представлено непрерывной совокупностью равновесных состояний при бесконечно малом изменении внешних условий (например, температуры), и поэтому относится к равновесному процессу. Образование трехмерной структуры белка – процесс сугубо неравновесный, протекающий вдали от положения равновесия; в этом его суть. Если в первом случае малый сигнал на входе вызывает всегда малый эффект на выходе, то во втором случае небольшие изменения в окружении могут сопровождаться радикальными качественными изменениями в состоянии белковой цепи.

По признаку нерегулярности белок может быть сопоставлен с такой неупорядоченной системой как стекло. Однако и здесь аналогия имеет формальный характер; сходство не идет дальше простой констатации наличия нерегулярных структур у веществ, ни по каким другим свойствам между собой не совпадающим. Стекло постоянно пребывает в неравновесном состоянии, лишено линейной "памяти" и в силу этого – способности к самоорганизации. Его плавление и повторное застекловывание приводят к полному обновлению микроструктуры. Белок же при ренатурации восстанавливает свою структуру вплоть до положения каждого атома. Таким образом, структурная организация белковой молекулы и процесс ее самоорганизации не встречаются в уже достаточно детально изученных элементарных системах неживой природы.

Физические и химические свойства белков во многих отношениях не сопоставимы также со свойствами важнейших молекулярных компонентов живого – жирами, углеводами и нуклеиновыми кислотами. Химическое поведение последних определяется в основном локальными участками цепи. По сравнению с белками оно крайне просто и подчиняется классической теории химического строения. Жиры и высокомолекулярные углеводы в растворе не образуют фиксированных трехмерных структур. О пространственном строении нуклеиновых кислот следует сказать особо. Структурная организация и конформационные возможности дезоксирибонуклеиновых кислот в клетке определяются не столько самими молекулами ДНК, сколько их взаимодействиями с многочисленной группой так называемых ДНК-связывающих белков, среди которых центральная структурная роль принадлежит гистонам. Молекула ДНК, имеющая длину, например в хромосоме человека, несколько сантиметров, с помощью гистонов упакована в клеточном ядре, диаметр которого равен лишь нескольким микрометрам. Самым нижним уровнем упаковки является двой-

ная спираль ДНК Уотсона–Крика. Ее ассоциация с гистонами приводит сначала к образованию нуклеосомы – основной структурной единицы хроматина, а затем – бусеничной нуклеосомной нити. Из нитей последовательно формируются хроматиновые фибриллы, петельные домены, конденсированные участки хромосомы и, наконец, метафазная хромосома. В процессе создания этой сложной структурной организации сама молекула ДНК удивительно пассивна и не проявляет склонности к самосборке. Можно утверждать, что пространственная структура ДНК, как и реализация ее функций, определяется белками.

Более самостоятельны в организации своей пространственной структуры рибонуклеиновые кислоты, особенно транспортные (тРНК) и рибосомные (рРНК). Молекулы всех одноцепочечных, относительно низкомолекулярных полинуклеотидов тРНК имеют сходные черты в химическом строении и универсальный мотив складывания основной цепи во вторичную структуру ("клеверный лист") и третичную структуру, имеющую у всех транспортных рибонуклеиновых кислот *L*-образную форму. Главной причиной, заставляющей молекулу тРНК принять определенную конформацию, служит взаимодействие между комплементарными парами азотистых оснований на трех внутренних участках цепи и расположенных антипараллельно 5'- и 3'-концевых участков. При создании и стабилизации трехмерных структур тРНК реализуется также целый ряд неканонических взаимодействий между основаниями. Переход от тРНК к обладающей аминокислотной специфичностью аминоацил-тРНК-синтетазе заметным образом не изменяет компактность полинуклеотидного каркаса, который образовался спонтанно при сборке транспортной рибонуклеиновой кислоты. Пространственные структуры различных рибонуклеопротеидных аминоацилсинтетаз включают две или четыре белковые субъединицы, идентичные или неидентичные. Таким образом, молекулы тРНК, имеющие одинаковый рисунок складывания цепи, обладают, как и белки, способностью спонтанно обретать строго детерминированные пространственные структуры. В отношении рРНК столь же однозначного вывода сделать нельзя. При определенных условиях прокариотическая рибосома 70S диссоциирует на две субъединицы с коэффициентами седиментации 50S и 30S (их молекулярные массы соответственно равны $1,5 \cdot 10^6$ и $0,85 \cdot 10^6$ Да), а эукариотическая рибосома 80S распадается на 60S и 40S субъединицы. Каждая рибосомная частица содержит определенный набор белков, большинство которых представлено лишь в одном экземпляре. Малая частица рибосомы *E. coli* содержит 21 белок (S1–S21), а большая частица – 32 различных белка (L1–L32). А.С. Спирин отмечает: "Будет не очень большим преувеличением сказать, что рибосома есть прежде всего ее РНК. Примитивный предшественник рибосомы мог бы состоять только из РНК и лишь в ходе эволюции постепенно модифицироваться белками. Прокариотическая рибосома по массе на 2/3 состоит из РНК и лишь на 1/3 из белков. Эволюционно более поздняя эукариотическая рибосома уже наполовину состоит из белков" [48. С. 68].

Рассмотрим, в какой мере морфологические особенности малой и большой субъединиц обусловлены пространственной структурой рибосомных РНК и белков. Исследования А.С. Спирина и соавт. [49–51],

М. Номура и соавт. [52, 53] впервые показали, что формирование структурной организации рибосомы представляет собой самопроизвольно протекающий и обратимый процесс. Сборка как 30S, так и 50S рибосомных частиц *E. coli* с восстановлением их функциональных активностей может быть осуществлена при определенных ионных условиях из изолированных рибосомных РНК и двух полных наборов индивидуальных рибосомных белков. Однако это не означает, что свертывание полинуклеотидных последовательностей обеих рибосомных субъединиц от полностью развернутых состояний с коэффициентами седиментации 2–5S (реализуются в отсутствие ионов Mg^{2+} или при температуре выше 60°) до окончательной реконструкции активных форм (30S и 50S) является, действительно, процессом самосборки индивидуальных полинуклеотидных цепей с последующей ассоциацией собранных структур с белками. Полинуклеотидная цепь малой (30S) частицы может свертываться спонтанно в относительно стабильную, но недостаточно компактную структуру 16S. Это состояние отвечает максимально плотной упаковке индивидуальной молекулы РНК малой частицы рибосомы, ее обычно обозначают 16S РНК, а аналогичное состояние большой частицы – 23S РНК. В отсутствие солей или при умеренно высокой температуре обе частицы имеют разветвленную вторичную структуру, представляющую собой сложную сеть относительно коротких двуспиральных участков. Длина спиралей редко превышает размер одного витка, т.е. 10–12 пар комплементарных нуклеотидов, а средняя длина спиралей составляет около 7–8 нуклеотидных пар. Всего у 16S РНК *E. coli* обнаружено около 60 спиралей, а у 23S РНК – немногим более ста, которые группируются соответственно в 3 и 6 структурных доменов [48]. Дальнейшее свертывание и компактизация полинуклеотидных цепей, ведущих к образованию строго детерминированных трехмерных структур 30S и 50S рибосомных частиц, становятся возможными только при участии белков. Процесс протекает спонтанно в нескольких стадиях, каждая из которых сопровождается присоединением определенных белков и ступенчатым переходом от менее компактного к более компактному состоянию. На первой стадии присоединение шести белков уплотняет малую частицу сначала до 23S, а затем до 25S; последующая ассоциация девяти белков увеличивает коэффициент седиментации до 28S, а добавление еще шести белков доводит его до 30S. Эти данные получены М. Номура и соавт. [54, 55], которые осуществили полную реконструкцию биологически активных 30S субъединиц *E. coli* из индивидуальной РНК и соответствующего набора из 21 белка, инкубируя смесь при 0,3 М KCl, 20 мМ $MgCl_2$ и 40°C в течение 20 мин.

Разборка рибосомных частиц происходит при их инкубации в условиях повышенной ионной силы и высокой концентрации Mg^{2+} . Вначале процесс сводится лишь к диссоциации рибосомных белков в порядке, обратном наблюдаемому при сборке. Исследования пространственной структуры малой частицы рибосомной РНК с различным содержанием белков методами электронной микроскопии и малоуглового рентгеновского и нейтронного рассеяния убеждают в том, что всего шесть белков из 21, а именно те, которые первыми присоединяются к 16S РНК при сборке, удерживают плотность упаковки и форму полинуклеотидной цепи, свойственные функ-

ционально активному состоянию 30S [48]. Аналогичным образом, как при развертывании, так и свертывании ведет себя полинуклеотидная цепь субъединицы 50S E. coli. Ее 23S РНК сохраняет исходную пространственную структуру вплоть до стадии, при которой в частице удерживается всего девять белков из 32. Таким образом, обе рибосомные частицы представляют собой плотно упакованные рибонуклеопротеиды, в которых ковалентно непрерывными остовами являются молекулы рибосомных 16S и 23S РНК. Процесс структурной организации (точнее, самоорганизации) каждой частицы начинается с образования в определенной мере детерминированного, но в то же время лабильного рибонуклеотидного каркаса или центрального ядра, на периферии которого располагаются белковые глобулы. Ассоциация некоторых из белков с полирибонуклеотидной цепью уплотняет каркас и лишает его подвижности. А.С. Спирин в своей монографии отмечает: "Специфическая стабилизация определенными белками неустойчивых состояний элементов третичной и вторичной структуры РНК может быть общим принципом не только структурной организации рибосом, но и функционирования любых белково-нуклеиновых систем" [48. С. 125].

Итак, среди всех компонентов живой материи общность со структурной организацией белков обнаруживают только транспортные и отчасти рибосомные рибонуклеиновые кислоты. Свертывание тРНК не требует особого морфогенетического аппарата и участия белков. Самостоятельная сборка их индивидуальных цепей начинается с полностью развернутого состояния и заканчивается образованием одинаковых у всех молекул плотноупакованных стабильных L-образных структур, готовых после присоединения аминоацилсинтетазы к функционированию. Свертывание здесь, как и у белков, является нелинейным неравновесным процессом структурной самоорганизации, протекающим вдали от положения равновесия. У рибосомных РНК самосборка не идет до конца, а ограничивается образованием многочисленных участков вторичной структуры типа ДНК-спирали Уотсона-Крика, которые самостоятельно не могут упаковываться в устойчивую трехмерную структуру. Завершают создание рибонуклеотидных каркасов физиологически активных 30S и 50S субъединиц специальные строительные белки. Таким образом, сравнительно короткие рибонуклеотидные последовательности (тРНК) структурно самоорганизуются, а на порядок более длинные последовательности (рРНК) такой способностью не обладают. У аминокислотных последовательностей картина обратная: пространственное строение природных олигопептидов описывается набором близких по энергии и легко переходящих друг в друга конформаций, а пространственное строение полипептидов (белков) – единственной, строго детерминированной трехмерной структурой. Обращает на себя внимание еще одно различие между структурными организациями молекул нуклеиновых кислот и белков: чрезвычайно малые возможности первых (строго говоря, только тРНК) по сравнению с практически беспредельными, на первый взгляд, возможностями к самосборке своих пространственных структур вторых. Следовательно, в случае белков способность к спонтанной пространственной самоорганизации обладают почти все природные аминокислотные последовательности, а в случае ДНК и

РНК – лишь крайне ограниченное число нуклеотидных последовательностей. Причины этого станут очевидными после обсуждения теории структурной организации белковых молекул и конкретных результатов расчета. А сейчас рассмотрим специфику живого на молекулярном уровне.

Сопоставление свойств соединений органического и неорганического мира позволяет, как мне кажется, сделать вывод, что особое качество живой материи прежде всего обусловлено белками. Они в той же мере являются носителями активного начала всего живого, в какой ДНК – носителями потенциального начала. Исключительная роль природных аминокислотных последовательностей в процессах жизнедеятельности и структурировании макромолекулярных комплексов, органелл, клеток, тканей, органов и целых организмов заключается в присущей только им способности к структурной самоорганизации собственных молекул. В зависимости от внешнего окружения белковые цепи могут находиться в двух равновесных состояниях: в виде флуктуирующего статистического клубка и в форме компактной трехмерной структуры. Первое состояние лишено специфических черт живого и своим поведением мало отличается от синтетических полимеров в растворе. Аминокислотные последовательности обретают свои исключительные свойства – становятся белками – лишь во втором равновесном состоянии, когда цепи свертываются и принимают фиксированные формы, обладающие биологической активностью.

Активные формы природных аминокислотных последовательностей, согласно предложенным мною количественным теориям структурной и структурно-функциональной организации белковых молекул [56, 57], не относятся к какому-то особому состоянию материи, свойства которой, как физические, так и химические, не подчиняются законам, установленным при изучении иных систем, в том числе неорганических. Исключительность активных форм белков не в принципиальной новизне природы их физических и химических свойств, сколь бы необычными они ни казались, а в самом факте образования таких форм, в неизбежности этого явления только у природных аминокислотных последовательностей (и ограниченного круга рибонуклеотидных последовательностей).

Таким образом, можно утверждать, что специфика живой материи обусловлена белками, которые свои особые качества обретают в процессе самопроизвольного перехода полипептидной цепи от состояния флуктуирующего статистического клубка к нативной трехмерной структуре, в каждом случае уникальной по биологической функции. Именно спонтанное образование фиксированной активной пространственной формы молекулы белка, а не сама форма, есть изначальная причина фундаментальных особенностей живой материи. С чисто физической точки зрения этот уникальный акт творения живого заключается в спонтанной трансформации тепловой энергии необратимых флуктуаций в целенаправленную механическую работу создания высокоорганизованной системы. Белки представляются почти единственными в природе (по меньшей мере самыми совершенными и распространенными) автоматическими молекулярными преобразователями энергии хаотического теплового дви-

жения в энергию более высокого ранга – механическую и энергию стереоспецифических внутримолекулярных взаимодействий. Появившаяся самопроизвольно из хаоса упорядоченная трехмерная структура белка далее способна к трансформации всех других, необходимых для жизни видов энергии. С точки зрения равновесной термодинамики спонтанное возникновение в изолированной системе порядка из беспорядка нереально. Действительно, в самой собой протекающих в неживой природе процессах происходят превращения всех известных видов энергии в тепло, которое рассеивается, т.е. наблюдаются лишь самопроизвольные переходы порядка в хаос, но не наоборот.

Присущая белкам способность к структурной самоорганизации представляет собой элементарное фундаментальное качество живой материи, обуславливающее специфические особенности биологических систем всех последующих ступеней иерархической лестницы живого. Каков же механизм молекулярной структурной организации белка, этой аристотелевской энтелихи живой материи, и можно ли понять его на основе существующего уровня естественнонаучных знаний? Рассмотрению этого вопроса посвящена большая часть настоящей книги.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Тейяр де Шарден П. Феномен человека. М.: Наука, 1987.
- 2 Вернадский В.И. Труды по всеобщей истории. М.: Наука, 1988.
- 3 Толстой Л.Н. Война и мир. Т. 4. М.: Гослитиздат, 1949.
- 4 Бердяев Н.А. Самопознание. М.: Междунар. отношения, 1990.
- 5 Соловьев Вл. С. Литературная критика. М.: Современник, 1990.
- 6 Эйнштейн А. // Эйнштейн и современная физика. М.: Знание, 1956. С. 3–50.
- 7 Бердяев Н.А. Философия свободы. Смысл творчества. М.: Мысль, 1989.
- 8 Капица П.Л. // Вopr философии. 1979. № 1. С. 61–71.
- 9 Александров А.Д. Проблемы науки и позиция ученого. Л.: Наука, 1988.
- 10 Тимирязев К.А. Основные черты истории развития биологии в XIX столетии. Таннери П. Исторический очерк развития естествознания в Европе (1300–1900). М., Л.: Гостехтеоретиздат, 1934. С. 3–89.
- 11 Тимирязев К.А. Наука. Очерк развития естествознания за три века (1620–1920). Пг.: Науч. хим. техн. изд-во, 1920.
- 12 Достоевский Ф.М. Братья Карамазовы. Т. 2. М.: Правда, 1980.
- 13 Гете И. Собрание сочинений. Т. 2. М., Л.: Изд-во АН СССР, 1932–1949.
- 14 Декарт Р. Сочинения. В 2 т. Т. 1. М.: Наука, 1989.
- 15 Einstein A. The world as I see it. L.: Macmillan, 1935.
- 16 Бернал Дж. Наука в истории общества. М.: Изд-во АН СССР, 1956.
- 17 Кудрявцев П.С. История физики. Т. 1. М.: Учпедгиз, 1956.
- 18 Баландин Р.К. Вернадский. Жизнь, мысль и бессмертие. М.: Наука, 1988.
- 19 Зайцев Б.К. Голубая звезда. М.: Моск. рабочий, 1989.
- 20 Капица П.Л. Эксперимент, теория, практика. М.: Наука, 1987.
- 21 Менделеев Д.И. Периодический закон. Основные статьи. М.: Изд-во АН СССР, 1958. (Классики науки).
- 22 Пригожин И., Стенгерс И. Порядок из хаоса. М.: Прогресс, 1986.
- 23 Eddington A. The nature of the physical world. Ann Arbor Univ. Mich. press, 1958.
- 24 Пригожин И. От существующего к возникающему. М.: Наука, 1976.
- 25 Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Статистическая физика. М.: Наука, 1976.
- 26 Попов Е.М., Демин В.В., Шибанова Е.Д. Проблема белка. Т. 2. Пространственное строение белка. М.: Наука, 1996.
- 27 Вернадский В.И. Философские мысли натуралиста. М.: Наука, 1988.
- 28 Черняк В.С. История логики, наука. М.: Наука, 1986.

- 29 Дарвин Ч Происхождение человека и половой отбор М Изд-во АН СССР, 1953 (Сочинения Т 5)
- 30 Вернадский В И Избранные труды по истории науки М Наука, 1981
- 31 Кузнецов И В // Вернадский В И Философские мысли натуралиста М Наука, 1988 С 460–480
- 32 Алексеев В П Становление человечества М Политиздат, 1984
- 33 Янин А Л // Вернадский В И Труды по всеобщей истории М Наука, 1988 С 3–16
- 34 Микulinский С Р // Вернадский В И Философские мысли натуралиста М Наука, 1988 С 481–488
- 35 Мень А История религии Т 1 М Слово, 1991
- 36 Солженицын А И // Новый мир 1991 № 5 С 145–153
- 37 Булгаков С Интеллигенция и религия М Печатня А И Снегиревой, 1908
- 38 Лункевич В В От Гераклита до Дарвина Т 3 М Л Изд-во АН СССР, 1943
- 39 Чижевский А Л Земное эхо солнечных бурь М Наука 1973
- 40 Хайек Ф А // Новый мир 1991 № 7 С 160–181
- 41 Чижевский А Л Вся жизнь М Наука, 1974
- 42 Винер Н Кибернетика и общество М Изд-во иностр лит 1958
- 43 Гленсдорф П Пригожин И Термодинамическая теория устойчивости и флуктуаций М Мир, 1973
- 44 Васильева Т С Орлов В В Химическая форма материн Пермь Кн изд-во, 1983
- 45 Федина Г А Проблема развития в химии Л Наука, 1985
- 46 Haldane J S The philosophy of biologist Oxford Clarendon Press, 1935
- 47 Шредингер Э Что такое жизнь? С точки зрения физики М Атомиздат, 1972
- 48 Спирин А С Молекулярная биология Структура рибосом и биосинтез белка М Вышшк, 1986
- 49 Спирин А С Киселев Н А Шакулов Р С Богданов А А // Биохимия 1963 Т 28 С 920–930
- 50 Спирин А С Лерман М И Гаврилова Л П, Белицина Н В // Там же 1966 Т 31 С 424–429
- 51 Spirin A A // FEBS Lett 1974 Vol 40 P 538–547
- 52 Mizushima S Nomura M // Nature 1970 Vol 226 P 1214–1218
- 53 Nomura M Erdmann V // Ibid Vol 228 P 744–748
- 54 Traub P Nomura M // J Mol Biol 1969 Vol 40 P 391–413
- 55 Held W A Nomura M // Biochemistry 1973 Vol 12 P 3273–3281
- 56 Попов Е М Структурная организация белков М Наука, 1989
- 57 Попов Е М Структурно-функциональная организация белков М Наука, 1992

Часть I

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКА

Глава 1

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ЗАДАЧИ ПРОБЛЕМЫ БЕЛКА

Исследования белка, как экспериментальные, так и теоретические, независимо от конкретных целей и используемых методов, естественным образом подразделяются на пять фундаментальных задач, составляющих единую проблему. Первые две задачи включают изучение химического и пространственного строения белковых молекул. Они были рассмотрены в предшествующих томах настоящего издания [1, 2]. Третья задача заключается в установлении взаимосвязи между природными аминокислотными последовательностями, нативными пространственными формами и динамическими конформационными свойствами, т. е. в определении молекулярной структурной организации белков. Но прежде чем перейти к обсуждению этой задачи, целесообразно вновь обратиться к уже рассмотренному материалу и подвести некоторые итоги.

1.1 ХИМИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ БЕЛКА

В истории химии белка обращает внимание прежде всего беспрецедентная продолжительность поиска решения структурной задачи. Только на установление химического типа белковых молекул потребовалось с момента выделения первого белкового препарата (1728 г.) более двухсот лет. На достижение тех же целей, касающихся жиров, углеводов и нуклеиновых кислот, затрачено значительно меньше времени и сил. Химические типы первых двух были установлены в 80–90-е годы XIX в. Хотя принцип построения молекул нуклеиновых кислот стал известен практически одновременно с белками, выделены они были только в 1859 г. (Ф. Мишер), а обратили на себя серьезное внимание лишь в 30-е годы XX в. (П. Левин). Целенаправленное изучение химического строения нуклеиновых кислот как молекулярной первоосновы генетического материала началось после исследования О. Эвери в 1944 г. и завершилось классическими работами Э. Чаргаффа уже в 1961 г., когда был окончательно установлен химический тип молекул ДНК.

Естествен вопрос, что же сдерживало выявление структурных черт, общих для всего класса белков. Объясняется ли длительность поиска случайным стечением обстоятельств и трудностями технического порядка или же имелись субъективные причины и продолжительность и тернистость пройденного пути были неизбежны? Ведь если сравнить формулы отмеченных природных соединений, то вряд ли белки покажутся значительно сложнее нуклеиновых кислот или сахаров. Скорее наоборот, тип их химического строения скорее может удивить своей простотой. Проблема белка, как и другие проблемы естествознания принципиального характера, имеет свою судьбу. Помимо субъективного фактора, решение здесь зависит от уровня теоретического и экономического развития фундаментальных наук и объема накопленных знаний, актуальных именно для данной проблемы. Проследим с этой точки зрения историю химических исследований белковых молекул.

Первая попытка решить вопрос о внутреннем устройстве белков была предпринята в конце 30-х годов XIX в. накануне становления органической химии. Следовательно, при этом исходили только из экспериментальных возможностей и теоретических представлений сложившейся к тому времени уже в качестве научной дисциплины минеральной (неорганической) химии. Предложенная на этой основе Г. Мульдером протеиновая теория оказалась, однако, несостоятельной и вскоре была отвергнута. Это не было только неудачей автора; улучшить теорию было невозможно, так как она являлась неудовлетворительной в своих исходных позициях. Стало ясно, что неорганическая химия вообще некомпетентна решить первую фундаментальную задачу проблемы белка, и подобные попытки больше не повторялись.

Условия для появления иного подхода к рассмотрению вопроса о химическом типе белковых молекул возникли лишь через 40–50 лет, после создания теоретических основ классической органической химии, где центральное положение заняла теория химического строения молекул (1861 г.). Суть теории сводилась к утверждению, сейчас очевидному, о существовании неразрывной связи между молекулярным строением соединения и его химическими свойствами, что по существу означало формулировку глобальной цели теоретической химии – раскрытие этой связи и установление ее природы. Автор теории А.М. Бутлеров постулирует положение, согласно которому можно предсказать химическое строение молекулы, т.е. все входящие в нее атомные группы и химические связи, если для данного соединения известны присущие ему химические реакции, и наоборот. На первое место, как необходимые, ставились реакции замещения, расщепления и синтеза. Таким образом, если это предположение справедливо, то все проблемы, возникающие при установлении строения органических молекул, становятся, по выражению Бутлерова, "разрешимыми путем химического опыта". Теория химического строения оказалась чрезвычайно плодотворной. Не встретив противоречий ни с одним из известных в то время опытных фактов, она открыла широчайшие перспективы для дальнейшего более целенаправленного развития органической химии. После появления стереохимической теории Я. Вант-Гоффа и Ж. Ле Беля (1874 г.) теория Бутлерова, как показала вся последующая

история химии, не знала исключений принципиального порядка. Противоречия с теорией не допускались, а при их появлении признавались артефактами, что и подтверждалось позднее. Ценность теории состояла еще и в том, что в течение многих десятилетий после ее создания в химии отсутствовали другие способы определения химического строения молекул. Появившиеся в первой половине XX в. физико-химические методы, прежде всего рентгеноструктурный анализ и методы молекулярной спектроскопии, подтвердили (и это поразительно!) практически все результаты предшествующего чисто химического подхода к исследованию строения, в том числе и пространственного, органических молекул. Иными словами, основные структурные особенности микроскопических частиц были правильно предсказаны при изучении поведения макроскопических систем.

Под воздействием впечатляющих достижений органической химии в химии белка постепенно начинает утверждаться представление о том, что познание свойств белковых молекул и их роли в процессах жизнедеятельности неизбежно должно пройти через установление вначале химического типа веществ этого класса, а затем структурных формул конкретных белков. Положение о том, что знание химической формулы молекулы является необходимым и достаточным условием для понимания ее характерных реакций, стало в химии белка конца XIX в. таким же общепринятым, как и в органической химии. Оно уже не нуждалось в особых доказательствах и воспринималось буквально так, что по известной химической формуле всегда можно предсказать характер химического поведения соединения.

Первую попытку использовать теорию химического строения органических молекул в химии белка предпринял П. Шютценберге, выдвинув в 1876 г. так называемую уредидную структурную гипотезу белковых молекул. К 1891 г. А.Я. Данилевским была разработана теория химического строения белков, получившая название "теории элементарных рядов". В ней особенно чувствуется стремление автора полнее использовать достижения классической органической химии. В. Коссель предложил в 1898 г. протаминовую гипотезу, базировавшуюся на известных в то время аналитических данных о составе продуктов кислотного и щелочного гидролиза белков. К этому же кругу работ можно отнести исследования М. Зигфрида (1904 г.), пытавшегося из белковых гидролизатов выделить "ядра" в виде отдельных структур и приписать им определенные химические формулы. Понимание авторами отмеченных теорий необходимости знания структуры не сопровождалось, однако, ясным представлением о способах достижения цели. Предложенные ими формулы в значительной мере представляли собой выраженные в дефинициях органической химии фантазии на заданную тему. Все они, как и формулы Мульдера, предполагали фрагментарное строение белковых молекул. Даже выдающимся химикам конца XIX–начала XX в., особенно после упомянутых выше неудачных попыток, задача химического строения белков стала казаться непостижимо сложной, превышающей методологические возможности органической химии.

Во второй половине XIX в., пожалуй, впервые к изучению белков проявила интерес биология. Это было связано с начавшимся изучением живой

природы на клеточном уровне, которое поставило вопрос о физических, химических и физиологических свойствах основного компонента клеток – белков. В. Кюне впервые попытался систематизировать и обобщить данные не только кислотного и щелочного, но впервые и ферментативного расщепления белков (были известны лишь пепсин и трипсин). На этой основе он высказал предположение о единой структурной модели белковых молекул, согласно которой они состоят из двух частей. Одна из них – антигруппа, устойчива к действию протеолитических ферментов, другая – гемигруппа, расщепляется ими на аминокислоты и ряд других низкомолекулярных соединений.

Пессимизм в отношении возможностей органической химии решить задачу химического строения белков удалось развеять Э. Фишеру, самому авторитетному химику конца XIX–начала XX в. Он выдвинул эвристическую идею о полипептидном строении белков, которая включала ряд постулатов, необходимых для формулировки принципов структурной организации молекул этого класса. После создания гипотетической модели Фишером составлена обширная программа ее опытной проверки. При ее реализации не было получено ни одного результата, который бы противоречил априори выдвинутому предположению о химическом типе белков. Все они свидетельствовали о том, что белковые молекулы представляют собой линейные полимеры, построенные из аминокислотных остатков, соединенных пептидными связями. Таким образом, можно было утверждать, что химический тип белков установлен и следует приступить к решению других вопросов первой фундаментальной задачи проблемы – разработке методов анализа и синтеза природных аминокислотных последовательностей.

Последующая история химии белка, однако, развивалась по другому сценарию, на первый взгляд, несколько парадоксальному. Вместо проведения исследований, естественным образом ориентированных как в идейном, так и в методологическом отношении четкими положениями фишеровской теории, наступил длительный (до конца 40-х годов) период инерции развития химии белка. От пептидной теории сразу же после кончины Фишера (1919 г.) отошли его ближайшие ученики: Э. Абдергальден, М.Бергман и А. Фодор. В лучшем случае, многими она стала восприниматься как частная теория, утверждавшая наличие в структуре белка небольших пептидных фрагментов.

Н.Д. Зелинский и В.С. Садиков и почти одновременно Э. Абдергальден предложили в 1923 г. так называемую дикетопиперазиновую теорию строения белков. Она просуществовала почти четверть века, была популярной, однако далеко не единственной. Н. Трензегор (1923 г.) разработал другую теорию, которая также исходила из предположения, что аминокислоты не преформированы в белке, а возникают вторично, но на сей раз при гидролизе не дикетопиперазиновых циклов, а пирролидоновых и пирроловых колец. Существование пиррольных структур в белковой молекуле он допускал, основываясь на их обнаружении в продуктах сухой перегонки белков и на присутствии пиррольных производных (пролина и гидроксипролина) в гидролизатах. П. Каррер (1923 г.) предполагал участие в построении белковых молекул имидазола и оксазола, а также дике-

топиперазинов в нескольких таутомерных формах. М. Бергман (1925 г.) считал, что белки построены из пиперазиновых колец, соединенных между собой валентными и латентными связями. Особое значение он отводил остаткам серина и цистеина, гидроксильные и сульфгидрильные группы которых, взаимодействуя между собой, образовывали сложные циклические соединения. С. Краффт (1930 г.) предложил для структуры белков так называемую спиразиновую теорию строения, а П. Бригль и Р. Хельд (1926 г.) – гидантоиновую. А. Фодор (1930 г.) выдвинул гипотезу, согласно которой белки представляют собой сложные трехмерные сетчатые структуры, включающие кольца различных размеров и разной природы. Д. Ринч (1936 г.) предложила еще более экстравагантную циклольную гипотезу строения белковых молекул, которую активно поддерживал И. Ленгмюр.

Перечень предложенных в 1920–1940 гг. теорий и гипотез можно было бы продолжить, но, по-видимому, приведенных уже достаточно для постановки следующих двух вопросов: чем были вызваны фактический отказ от пептидной теории Фишера и появление такого большого количества существенно отличающихся и даже взаимоисключающих друг друга концепций химического строения белков и почему все они, несмотря на пестроту в химическом отношении, непременно постулировали существование белковых молекул только в форме циклических группировок? Для сложившейся в послефишеровский период ситуации характерно прежде всего наличие заметного несоответствия между достаточно высоким уровнем развития аналитической и синтетической органической химии и неудовлетворительным состоянием белковых исследований. В химии белка отсутствовали надежные количественные методы выделения, очистки и анализа, а также методы расщепления, гарантирующие от вторичных реакций и образования побочных соединений. По этим причинам, а часто и вследствие неиндивидуальности выделенных белков среди продуктов их распада находили массу самых разнообразных веществ, строение которых органическая химия того времени уже умела анализировать. Поскольку разделить их на первичные и вторичные не представлялось возможным, выбор в каждом случае оказывался случайным, обусловленным вкусами и интуицией автора. Это ответ на вторую часть первого вопроса.

Почему же подавляющее большинство химиков не воспринимали пептидную теорию Фишера? Основных причин, сдерживающих принятие строения белков в виде исключительно линейной полипептидной аминокислотной последовательности, по-видимому, было две. Одна заключалась в том, что структуры такого типа до второй четверти XX в. были практически не известны ни среди синтетических органических соединений, ни среди природных веществ. Лишь в 1926 г. Г. Штаудингером было впервые показано, что многие синтезированные им высокомолекулярные вещества представляют собой нитевидные цепи, состоящие из огромного числа звеньев, связанных обычными валентными связями. Однако новый взгляд на структуру полимеров вначале не был принят научной общественностью. Вторая причина связана с трудностью, испытываемой биохимиками и органиками начала XX в., совместить в сознании линейную

белковую цепь с глобулярной, детерминированной в физиологических условиях формой молекулы огромной массы. В то время мало что было известно о невалентных взаимодействиях атомов. Отсюда стремление к валентным циклам.

Существовало и другое представление о белках, как об очень подвижных, ни на что не похожих веществах. Хотя оно было малопродуктивным, тем не менее его придерживалось большинство биохимиков. Их взгляды отражает следующее высказывание В.С. Садикова, одного из авторов дикетопиперазиновой теории. В 1933 г., т.е. спустя десять лет после созданной им вместе с Зелинским теории, он писал: "...белковые вещества являются не обычными, хотя и весьма сложными органическими соединениями, а органическими соединениями, своеобразными вследствие того, что они способны переходить в какое-то крайнее лабильное состояние, свойственное живому организму..., в виду своей сверхлабильности нативные белки не имеют постоянства состава и постоянства строения; это вещества с неопределенным текучим составом и текучим строением" [3. С. 81]. От истинного строения белков такое представление находилось столь же далеко, как и представление Мульдера. Впрочем, высказанная Садиковым мысль о физической и химической неопределенности белков также не была оригинальна. Задолго до него Э. Пфлюгер делил белки на "живые" и "неживые", а Э. Геккель представлял их в виде чуть ли не одушевленных бесструктурных микрочастиц организма, которым отказывал не только в детерминированной пространственной структуре, но и в постоянном химическом строении.

Примечательно, что и сам Э. Фишер не считал свою пептидную теорию полностью адекватной реальному химическому строению белковых молекул. Он допускал присутствие в структуре белков дикетопиперазиновых циклов, а также существование большого числа разнообразных химических связей между функциональными группами боковых цепей аминокислотных остатков. Э. Фишер представлял ферменты (которые он едва ли не единственный уже в конце XIX в. считал белками или близкими к ним) в виде "специальных машин сложнейшей конструкции", функциональная специфичность которых обусловлена взаимодействиями по принципу "замка и ключа". Поскольку он, как и его современники, исключительное значение в формировании белков придавал только валентным связям, то пространственное строение белковой молекулы представлял себе в виде глобулярной структуры, в которой свернутая пептидная цепь, включающая одиночные дикетопиперазиновые циклы, дополнительно сцементирована сложной сетью радиальных химических связей между боковыми цепями аминокислот. "Я почти не сомневаюсь в том, – писал Фишер, – что органический мир, обнаруживающий колоссальное разнообразие в морфологическом отношении, в химическом отношении, в частности в построении белков, далеко не подчиняется тем ограничениям, которые предписывает ему наше неполное знание" [4. С. 356]. Следовательно, теория Фишера была строгой только в констатации значительного содержания в белковых молекулах полипептидных фрагментов. Положение о полностью линейном полипептидном строении белков могло быть тогда лишь гипотетическим. Однако такой гипотезы

ни Фишер, ни кто-либо другой не выдвигали. Можно утверждать, что даже если бы она и была кем-то предложена, то доказать ее в то время только методами органической химии не представлялось возможным. В окончательном решении этого вопроса органическая химия, как в свое время неорганическая, оказалась некомпетентной.

Установление химического типа белков (и только белков!) является для чисто химических методов принципиально неразрешимой задачей, так как белки не являются классическими объектами органической химии. Они обладают практически неограниченной химической потенцией, и их исключительность состоит не в особой склонности к тем или иным, вполне определенным и характерным только для них химическим реакциям, а, напротив, в их универсальности. Химическое поведение белков характеризуется необозримо широким спектром действия, несопоставимым по своему функциональному многообразию с действиями любого другого класса молекул живой и неживой природы или соединений, синтезированных человеком. Именно благодаря универсальным биохимическим свойствам белков назначение генетического аппарата любого живого организма сведено только к их синтезу. В органической химии аналитические методы основаны на эмпирическом тестировании реакций, на выявлении тех химических особенностей, которые присущи лишь данному типу молекул или атомных групп. Со времени Бутлерова считалось незыблемым, что такому условию удовлетворяют все синтезируемые соединения. Не явились исключением здесь и жиры, углеводы и нуклеиновые кислоты. Поэтому определение типов их молекулярного строения на чисто химической основе не встретило непреодолимых осложнений. Подчеркнем, что сказанное относится ко всем природным и синтетическим полимерам, в том числе и к ближайшим искусственным аналогам белков — полиаминокислотам. Таким образом, предпринятые после Фишера попытки решить с помощью органической химии структурную задачу белков не достигли и не могли достичь цели. История химии белка данного периода скорее свидетельствует об обратном — имевшее место увеличение количества химических данных о белках сопровождалось ростом неопределенности в понимании их химического строения. Изучение на такой основе белков не приближало, а, напротив, уведило в сторону от решения этой типичной по своей постановке для синтетической органической химии задачи.

На рубеже XIX–XX вв. к изучению белков подключаются физическая химия, а немного позднее — новейшая физика, что, однако, далеко не сразу стало способствовать решению задачи. И здесь обилие новых данных, на первых порах неправильно истолкованных, приводило к тому, что белки представлялись еще более загадочными как в физическом, так и в химическом и биологическом отношениях. Физические исследования белков начались с изучения их коллоидного состояния, выявления диффузионных, осмотических, седиментационных и электрохимических свойств. Впервые было получено представление о форме и размерах большого числа белков в активном состоянии, а также достаточно надежно определены их молекулярные массы. При существовавшем в первые десятилетия XX в. уровне знаний о строении молекул, тем более макромолекул, новые

физические данные в наибольшей мере отвечали структурам, построенным из валентно-связанных между собой циклов, обладающих высокой реакционной способностью.

Начавшееся физическое изучение белковых молекул со временем приобретает исключительно важное значение. Физика привнесла в эту область строгость и глубину своих воззрений и концепций, количественные теоретические и экспериментальные методы. Квантовая механика, работы В. Кеезома (1916 г.), Д. Дебая (1920 г.), В. Гейглера и Ф. Лондона (1928 г.), Ф. Хунда (1928 г.), Э. Хюккеля (1930 г.), Дж. Леннарда-Джонса (1931 г.), Л. Полинга (1936 г.) и многих других физиков подвели черту под развитием классической органической химии и заложили основы современной теоретической химии (квантовой механики молекул или квантовой химии). Они показали, что помимо валентных взаимодействий атомов существуют и могут оказывать заметное влияние на химическое поведение и формообразование молекул, особенно макромолекул, ранее не принимавшие во внимание невалентные взаимодействия атомов (дисперсионные, электростатические, торсионные, водородные связи). Для познания белков, чувствительных к внешним условиям, использование физических и физико-химических методов, гарантирующих, как правило, не только химическую, но и пространственную целостность молекул, имело важное, часто определяющее значение на всех этапах исследования белков: от выделения и очистки до установления пространственной структуры и выяснения механизмов функционирования.

Таким образом, к решению задачи химического строения белков присоединилась еще одна область естествознания – физика. С 1920-х годов белок становится объектом всесторонних химических, биологических и физических исследований, а проблема белка (в ту пору она сводилась, по существу, только к установлению химического типа белковых молекул) – проблемой всего естествознания.

Если белки в чем-то и проявляют общность в химическом поведении, позволяющем отнести их к одному классу веществ, то это только по отношению к протеолитическим ферментам. Подробно о становлении и развитии энзимологии, а также о механизме ферментативного расщепления белков говорится в следующем томе настоящего издания. Сейчас важно отметить, что в рассматриваемый период в этой области произошли глубочайшие изменения. Обратим внимание лишь на два события, которые оказали решающее влияние на изучение химического строения белковых молекул. Первым из них явилось установление Дж. Самнером (1926 г.) и Дж. Нортропом (1930 г.) белковой природы ферментов, что привело к совмещению задач химического и пространственного строения последних с задачами остальных белков. Второе событие заключалось в строгом доказательстве Э. Вальдшмидт-Лейтцем (1930-е годы) исключительно аминокислотного состава белкового гидролизата, полученного при дробном ферментативном гидролизе, т.е. комбинированном действии представительного набора ставших известными к тому времени протеолитических ферментов. Э. Вальдшмидт-Лейтц показал, что белки являются линейными полипептидами, звенья которых состоят из двадцати стандартных аминокислот с *L*-конфигурацией центрального углеродного

атома (C^α). Итак, тип химического строения белков был установлен, причем установлен с помощью самих же белков биологическими методами, а не методами органической химии.

К середине 1940-х годов пептидная теория белков Фишера и Вальд-шмидт-Лейтца была почти повсеместно принята. Встал вопрос о точном знании деталей химического строения, т.е. о конкретном порядке расположения аминокислот в белковых цепях. Впервые такое сложное исследование удалось провести в течение десятилетия (1945–1954 гг.) Ф. Сенгеру, определившему аминокислотную последовательность инсулина. Вторым белком была рибонуклеаза А. Полная структура этого фермента расшифрована С. Муром, К. Хирсом и У. Стейном (1960 г.). Вскоре идентификация химического строения белков стала производиться с помощью автоматических секвенаторов и приобрела рутинный характер. Однако достижения в решении первой фундаментальной задачи проблемы белка не принесли удовлетворения. Сначала не вызывало сомнений, что химические и физические свойства белков получают свое объяснение, как только станет известно химическое строение их молекул. Однако основанная на опыте всей органической химии и биохимии надежда на то, что установление химического типа и строения молекул окажется достаточным для понимания хотя бы в общих чертах их специфического функционирования, не оправдалась. Тем самым определение структуры из конечной цели исследования превратилось в необходимый для последующего изучения белков начальный этап. Утвердилась мысль, что химическая универсальность и практически необозримое многообразие свойств соединений этого класса при строгой специфичности его отдельных представителей связаны с особенностями пространственных структур белковых молекул.

1.2. ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ БЕЛКА

Положение о том, что понимание химических и физических свойств белков требует знания пространственного строения молекул, впервые, по-видимому, было высказано К. Мейером и Г. Марком в 1930 г. Более того, они предприняли попытку установить прямую связь между некоторыми физическими свойствами белков и пространственной структурой, подобно тому, как это уже делалось в химии при определении зависимости между химическими свойствами и строением молекул. В частности, они предположили наличие непосредственной связи механического состояния специально приготовленных белковых препаратов при растяжении и сжатии с изменением молекулярной формы полипептидных цепей. Первыми объектами исследования пространственного строения с помощью рентгеноструктурного анализа стали фибриллярные белки, содержащие наряду с аморфной также упорядоченную часть, представляющую собой нечто вроде одномерного линейного кристалла. Г. Герцог и У. Янске, а позднее Р. Брилл получили в самом начале 1920-х годов рентгенограммы фиброина шелка. Их интерпретация основывалась на предположении дикетопиперазинового строения белка, что многими химиками было воспринято как

подтверждение теории Зелинского. К. Мейер и Г. Марк, позднее исследовавшие тот же белок, пришли, однако, к другому заключению. Они показали, что рентгенограмма фиброина шелка лучше соответствует плоскому полипептидному строению белковой цепи с трансойдной конфигурацией пептидных групп. Тот же вывод сделал О. Кратки (1929 г.). По построенной им пространственной модели этого белка, включающей только остатки глицина и аланина, была рассчитана плотность фиброина шелка; полученное значение ($1,46 \text{ г/см}^3$) совпадало с известными тогда экспериментальными величинами ($1,33\text{--}1,46 \text{ г/см}^3$). О. Кратки определил параметры элементарной ячейки, предположив, что через нее проходят параллельные друг другу четыре плоские полипептидные цепи на расстояниях соответственно $4,4$ и $4,8 \text{ \AA}$.

Столь же часто в то время объектом рентгеноструктурного анализа был коллаген – самый распространенный в клетках и живых организмах структурный белок. Рентгеновскую дифракцию на коллагене в его нативном и аморфном (желатине) состояниях наблюдали П. Шеффер (1920 г.), Дж. Катц и О. Гернграсс (1925 г.), Г. Герцог и У. Янске (1926 г.) и др. Период идентичности по оси волокна у коллагена, согласно Н. Сузиху, равен $8,4 \text{ \AA}$, а у фиброина шелка, по данным О. Кратки, – $7,0 \text{ \AA}$. Значительное отличие этих величин свидетельствовало о разной пространственной структуре двух молекул, что, в свою очередь, указывало на различие в их химическом строении. К. Мейер впервые провел аналогию между свойствами коллагена и каучука. В нагретом, съезжившемся состоянии белок по механическим свойствам напоминал аморфный каучук, получавшийся при нагревании, а в естественных условиях проявлял свойства растянутого каучука. Был сделан вывод о том, что белковые цепи могут существовать в полностью растянутой и свернутой формах, конкретный вид которых остался, однако, неизвестным.

К. Мейер предпринял совместное исследование механических свойств мышечных белков с дифракцией рентгеновских лучей. Было показано, что в расслабленном мускуле цепи главных валентностей ориентированы параллельно друг другу, а в сокращенном – каким-то иным способом. У высушенного в растянутом состоянии мускула Мейер наблюдал дифракционную картину, типичную для волокнистой структуры; диаграмма высушенного сокращенного образца отвечала аморфному состоянию. Прямо связывая макроскопические механические изменения белкового вещества с его молекулярным химическим и пространственным строением, автор предположил, что источником мускульной энергии является экзотермическая химическая реакция, что позднее было подтверждено экспериментально В.А. Энгельгардтом и М.Н. Любимовой (1942 г.).

Рентгеноструктурные исследования, оказавшие огромное влияние на развитие кристаллографии белков, принадлежат У. Астбэри. Выбрав в качестве критерия структурный признак, он по наблюдаемым дифракционным картинам разделил фибриллярные белки на две группы. В первую (группа k.m.e.f.) вошли кератин, миозин, эпидермин, фибриноген, а во вторую (группа коллагена) – белки сухожилий, соединительных тканей, хрящей и др. У. Астбэри обнаружил, что белки группы k.m.e.f., имея

близкие рентгенограммы, а следовательно, и пространственные формы, названные им α -формами, обладают сходными эластическими свойствами. При растяжении образцов этих белков до предела ($\sim$ в 2 раза) резко меняются дифракционные картины, по-прежнему, оставаясь очень похожими. У. Астбэри сделал вывод о переходе белков группы k.m.e.f. в иную более вытянутую пространственную структуру, названную им β -формой. Характерной особенностью рентгеновской дифракции β -формы является наличие рефлекса $3,5 \text{ \AA}$, равного расстоянию между атомом C^α двух смежных аминокислотных остатков и кратного периоду идентичности полностью вытянутых цепей фиброина шелка ($7,0 \text{ \AA}$). Позднее Астбэри наблюдал у этих белков после их специальной термической обработки еще одну суперконтракционную форму. Вначале он полагал, что α - и вновь обнаруженная формы полипептидной цепи содержат дикетопиперазиновые циклы, а β -форма является полностью вытянутым полипептидом. Таким образом, согласно Астбэри, переходы между этими формами, происходящие при растяжении и сжатии белковых образцов, являются не чисто конформационными, а сопровождаются образованием и разрывом химических связей. В своих последующих работах и при конструировании новых моделей он исходил уже только из полипептидного строения белков. Трактровка Астбэри обратимого перехода $\alpha \rightarrow \beta$ основывалась на представлении β -формы в виде параллельных вытянутых плоских пептидных цепей, соединенных между собой водородными связями, а α -формы в виде плоской ленточной структуры с тремя остатками на изгиб. Это удовлетворяло наблюдаемым рефлексам на рентгенограммах приблизительно двойному соотношению длин α - и β -форм одинаковой плотности белков группы k.m.e.f. в обоих случаях и максимальной растяжимости образцов в два раза. Суперконтракционной форме Астбэри приписал плоскую ленточную структуру с четырьмя остатками на изгиб. Для белка группы коллагена он предложил две формы с параллельной и антипараллельной направленностью пептидных цепей, связанных между собой водородными связями. У. Астбэри был в числе первых исследователей пространственных структур синтетических полиаминокислот и глобулярных белков, в которых он также обнаружил α - и β -формы фибриллярных белков. Подводя итог его работам, следует прежде всего отметить высказанную им впервые гипотезу об общности молекулярного строения фибриллярных, глобулярных и денатурированных белков, оказавшую огромное влияние на концептуальное развитие последующих структурных исследований.

Заметный след в развитии представлений о пространственном строении синтетических пептидов и биополимеров оставил также М. Хаггинс. Он сформулировал количественные геометрические критерии, которым должны были удовлетворять модели пептидных цепей. В частности, он предполагал эквивалентность конформационных состояний всех звеньев белковой цепи и плоское строение пептидной группы, в равной мере предрасположенной к *цис*- и *транс*-конфигурациям. М. Хаггинс первый придал решающее значение водородной связи между пептидными группами N-H и C=O в формировании структуры аминокислотной последовательности, считая эту связь главной "упаковочной силой". Удовлетво-

ритель отмеченным геометрическим критериям могли только спиральные структуры основной цепи. Идея о спиральном строении полипептидных цепей была высказана Хаггинсом в 1942 г.

После того как Р. Вудвордом и К. Шрамом (1947 г.) был разработан более доступный метод синтеза полипептидов, изучение их конформационных состояний приобрело широкий размах. Пионерские работы с использованием рентгеноструктурного анализа и поляризованных инфракрасных спектров ориентированных образцов искусственных полиаминокислот были выполнены С. Бэмфордом, А. Эллиотом, Е. Амброзе и их сотрудниками. Полученные учеными результаты поставили под сомнение ряд структурных моделей полипептидной цепи, постулированных Астбэри и Хаггинсом. Ими, а также Г. Цаном (1947 г.), Т. Шиманучи и С. Мидзусимой (1948 г.) было предложено несколько новых регулярных пространственных форм основной цепи полипептидов.

В середине 1930-х годов Дж. Берналом, Д. Ходжкин, И. Фанкухеном, Р. Райли, М. Перутцем и другими исследователями начато изучение кристаллографических трехмерных структур глобулярных белков. Получены лауэграммы пепсина, лактоглобулина, химотрипсина и некоторых других хорошо кристаллизующихся водорастворимых белков. Картины рассеяния рентгеновских лучей от монокристаллов содержали десятки тысяч четко выраженных рефлексов, что указывало на принципиальную возможность идентификации координат во много раз меньшего числа атомов белковых молекул (за исключением водорода). На реализацию этой возможности ушло более четверти века. Однако сам факт наблюдения богатых отражениями рентгенограмм говорил о многом. Например, он позволил сделать вывод об идентичности всех молекул каждого белка в кристалле, как правило, не теряющего в этом состоянии свою физиологическую активность. Кроме того, были оценены ориентировочные размеры, формы, симметрия и молекулярные массы исследованных белков, размеры их элементарных ячеек, а также возможное число аминокислотных остатков в ячейке. Дальнейшее развитие этой области вплоть до начала 1960-х годов замкнулось на решении внутренних, чисто методологических задач, связанных с расшифровкой рентгенограмм.

В 1950 г. публикуется исследование Л. Брэгга, Дж. Кендрию и М. Перутца, в котором сообщаются не только вновь полученные авторами данные рентгеноструктурного анализа миоглобина и гемоглобина, но анализируется сложившаяся в кристаллографии белков общая ситуация. Авторы подводят итог предшествующим исследованиям в этой области и в заключении формулируют важную гипотезу о родственном пространственном строении белков, которая представляет собой дальнейшее, подкрепленное новыми наблюдениями развитие взглядов Астбэри и Хаггинса на структурное единство белковых молекул.

Вскоре появляется знаменитая серия работ Л. Полинга и Р. Кори (1951 г.), в которых авторы рассмотрели все ранее известные структурные модели полипептидов, в том числе предложенные Брэггом, Кендрию и Перутцем, и отвергли их. Вместо них они предложили две новые низкоэнергетические регулярные пространственные формы — α -спираль и β -складчатый лист. Один виток α -спирали включает 3,6 аминокислотных

остатка. Все пептидные группы в ней соединены водородными связями типа $5 \rightarrow 1$, при котором группа $C=O$ i -го остатка связана с $N-N(i+4)$ -го остатка. Вытянутые параллельные и антипараллельные β -складчатые листы удерживаются межцепочечными водородными связями. Обе структуры отвечают минимумам торсионных потенциалов. Проанализировав имеющийся экспериментальный материал по пептидам и белкам, Полинг и Кори не обнаружили ни одного факта, противоречившего предложенным ими регулярным формам. В результате анализа они пришли к выводу о структурной общности синтетических и природных полипептидов. Таким образом, предположение, впервые высказанное Астбэри, поддержанное Хаггинсом, а также Брэггом, Кендрю и Перутцем о том, что структуры фибриллярных и глобулярных белков, а также искусственных полипептидов могут быть описаны с помощью ограниченного набора канонических форм — блоков, получило в работах Полинга и Кори подтверждение и дальнейшее развитие. Еще более укрепилось представление о водородной связи как о главном факторе, стабилизирующем трехмерную структуру белковой молекулы. Согласно гипотезе, вошедшей в литературу под названием " α -спиральная концепция Полинга", основные цепи всех белков и синтетических полипептидов состоят почти исключительно из полностью насыщенных водородными связями α -спиралей и β -структур.

α -Спиральная концепция Полинга была с энтузиазмом встречена учеными. Вскоре она получила дополнительное экспериментальное подтверждение в работе Перутца и стала общепризнанной. Хотя в 1950-е годы не было известно ни одной трехмерной структуры глобулярных белков, тем не менее ни у кого не вызывало сомнений, что белковые молекулы построены из регулярных форм, главным образом α -спиралей. Именно на таком представлении о пространственном строении белков основана предложенная в 1952 г. К. Линдерстрем-Лангом классификация белковых структур на первичную, вторичную и третичную. Фактически она представляла собой вытекающую из концепции Полинга формулировку принципа пространственной организации белков. В противном случае такая классификация теряла смысл.

Под влиянием α -спиральной концепции К. Линдерстрем-Ланг вместе с Дж. Шеллманом (1954 г.) предложили третичную структуру инсулина, состоящую из левой α -спирали цепи А и правой — цепи Б. В. Лоу (1955 г.) построила структурную модель этого же белка из двух левых α -спиралей, а Г. Линдли и Дж. Коллет (1955 г.) — из двух правых. Три совершенно различные структурные модели, но в равной мере основанные на максимизации α -спирального содержания, были предложены также для рибонуклеазы.

После опубликования работ Полинга и Кори стремительное развитие получило изучение пространственного строения синтетических полипептидов, начатое незадолго до этого Астбэри, Амброзе, Бэмфордом, Эллиоттом и др. Возникла надежда, граничащая с уверенностью, что изучение гомополипептидов различных аминокислот сможет существенно помочь в установлении принципов пространственной организации белков. Кажется, что оптимизм вполне оправдан, так как было показано, что синтетические полипептиды реализуются, хотя бы частично, в тех же

α -спиральных и β -структурных формах, аналогичных α - и β -формам кератина, миозина, фиброина шелка и др. Еще более убедительной стала выглядеть единственная в то время структурная гипотеза белков. Появилось основание считать полипептиды простейшими структурными аналогами белков в отношении не только химического строения, но и пространственного.

Интенсивное изучение пространственного строения синтетических полипептидов продолжалось в течение 1950-х и первой половины 1960-х годов. Были привлечены практически все известные физические и физико-химические методы, позволяющие получать информацию о строении молекул в твердом состоянии и в растворах. Наибольшее количество данных было получено с помощью рентгеноструктурного анализа, методов рассеяния рентгеновских лучей под малыми углами, дисперсии оптического вращения, кругового дихроизма и дейтерообмена, с помощью обычных и поляризованных инфракрасных спектров. Из полученных при исследовании синтетических полипептидов огромного экспериментального материала, однако, не удалось сделать обобщающих заключений о причинах стабильности регулярных структур и сказать что-либо определенное на этой основе о принципах структурной организации белков. И тем не менее, результаты исследования повсеместно были восприняты как подтверждающие ставшее общепринятым представление о том, что пространственное строение белковой глобулы представляет собой ансамбль унифицированных регулярных блоков вторичных структур, прямую информацию о геометрии которых дают высокомолекулярные синтетические пептиды. α -Спиральная концепция Полинга не только не была поставлена под сомнение, но еще более утвердилась. В 1967 г. Г. Фасман писал: "Общепризнано, что лишь несколько конформаций, благодаря своей внутренней термодинамической стабильности, будут встречаться наиболее часто и, по-видимому, именно они составляют общую основу белковой структуры" [5. С. 255]. Между тем, в то время уже были известны факты, настораживающие от безусловного принятия α -спиральной концепции Полинга. Но они выпадали из множества других фактов, согласующихся с традиционным представлением, казавшимся логичным и правдоподобным, к тому же не имевшим альтернативы. Поэтому на данные, противоречащие концепции Полинга, долгое время не обращали внимания.

Л. Брэггу и М. Перутцу в 1954 г. удалось впервые продемонстрировать возможность расчета знаков рефлексов в дифракционной картине гемоглобина, что означало решение одной из самых трудных проблем кристаллографии белков – проблемы фаз. Это было достигнуто методом изоморфного замещения, идея которого была подсказана авторам Дж. Берналом. Путь к получению трехмерных структур кристаллизующихся белков на атомном уровне был открыт. В 1960 г. Дж. Кендрию и сотрудники построили атомную модель молекулы миоглобина с разрешением 2,0 Å, а в 1968 г. М. Перутц и сотрудники – модель молекулы гемоглобина с разрешением 2,2 Å. Так был завершен титанический труд кристаллографов Кавендишевской лаборатории, продолжавшийся более четверти века.

Трехмерные структуры двух глобулярных белков дали блестящее и, казалось, бесспорное доказательство справедливости господствующим в течение почти двух десятилетий α -спиральной концепции Полинга и структурной классификации белков Линдерстрем-Ланга. В лишенных какой-либо симметрии белковых молекулах α -спираль, действительно, оказалась доминирующей структурой (75%), стабилизированной пептидными водородными связями типа $5 \rightarrow 1$. Идентифицированные структуры удовлетворительно согласовывались и с еще одной гипотезой структурной организации белков – гидрофобной концепцией У. Козмана.

Выше отмечалось, что, начиная с Хаггинса, огромную роль в стабилизации пространственной формы белковой цепи стали отводить пептидным водородным связям. Считалось, что именно они формируют вторичные структуры – α -спираль и β -складчатые листы. Но что в таком случае удерживает эти структуры в глобуле и под влиянием каких сил белковая цепь сворачивается в нативную конформацию в водной среде, где пептидные водородные связи $N-H \cdots O=C$ и электростатические взаимодействия малоэффективны? Можно поставить вопрос иначе. Почему внутримолекулярные взаимодействия у природной гетерогенной аминокислотной последовательности превалируют в водном окружении над ее взаимодействиями с молекулами воды? Фундаментальное значение в структурной организации белковой глобулы стали отводить так называемым гидрофобным взаимодействиям. Само понятие возникло в начальный период изучения коллоидного состояния высокомолекулярных веществ, в том числе белков. Первая теория явления, правда, не раскрывающая его сути, предложена, в 1916 г. И. Ленгмюром. Ему же принадлежит сам термин и разделение веществ на гидрофобные, гидрофильные и амфифильные. Природа гидрофобных взаимодействий была объяснена У. Козманом (1959 г.). Он показал, что низкое сродство углеводов и углеводородных атомных групп к водному окружению обусловлено не неблагоприятными с энергетической точки зрения межмолекулярными контактами, а понижением энтропии. На энтропийный фактор обращали внимание еще в 1930-е годы для объяснения причин образования мицелл моющих средств в водных коллоидных растворах (Дж. Батлер, Г. Франк, Дж. Эдзал), однако такая трактовка формирования компактных структур не была перенесена на белки. Впервые это сделал Козман, поэтому гидрофобная концепция носит его имя.

Анализ третичных структур миоглобина и гемоглобина Кендрию и Перутцем выявил расположение неполярных и полярных остатков в α -спиралях и взаимную ориентацию спиралей в глобулах. В соответствии с концепцией Козмана авторы отметили, что неполярные остатки, взаимодействуя между собой, преимущественно экранированы от водной среды, а полярные, напротив, чаще взаимодействуют с молекулами воды.

Третьим белком и в то же время первым ферментом, для которого стала известна трехмерная структура, был лизоцим. Расшифровка рентгенограммы выполнена Д. Филлипсом и сотрудниками в 1965 г. с разрешением 2,0 Å. Полученные результаты явились полной неожиданностью. Лизоцим в отношении вторичных структур существенно отличался от миоглобина и гемоглобина; его спиральные фрагменты содержали не 75%

всех остатков белка, как у первых двух, а менее трети, причем почти все они были сильно искажены и в них отсутствовали α -спиральные пептидные водородные связи ($5 \rightarrow 1$). Фактически в пространственной структуре лизоцима нет регулярных участков; лишь при большой фантазии и сильном желании, которые были проявлены, к ним смогли отнести только несколько коротких α -спиралей и один небольшой сегмент β -структуры.

В конце 1960 – начале 1970-х годов стали известны трехмерные структуры папаина, химотрипсिनогена, α -химотрипсина, β -трипсина, эластазы, стафилококковой нуклеазы, рибонуклеазы и некоторых других белков. Во всех случаях ситуация коренным образом отличалась от миоглобина и гемоглобина. Перечисленные белки содержали не более, чем у лизоцима, и столь же нерегулярные α -спирали и β -структуры.

После классических работ Перутца, Кендрю и Филлипса кристаллография белков стала быстро развиваться во многих научных центрах. К 1970 г. с помощью рентгеноструктурного анализа были получены трехмерные структуры 18 белков, к 1975 г. – 79, к 1979 г. – 161, к 1989 г. – 400. Сейчас это количество приближается к трем тысячам. Одновременно кристаллография белков все больше приобретает для биологии универсальное значение и, наконец, становится неотъемлемой частью исследований, направленных на решение фундаментальных научных и прикладных задач. В настоящее время знание молекулярной пространственной структуры во многом определяет уровень работ и значимость получаемых результатов.

По прошествии более трех десятилетий со времени расшифровки структур миоглобина и гемоглобина рентгеноструктурный анализ все еще остается единственным прямым методом определения на атомном уровне пространственного строения белковых молекул, их комплексов и доменов. Полученные с его помощью данные по-прежнему служат незаменимой экспериментальной основой изучения структурно-функциональной организации молекул белков. В 1990-е годы этот метод, по-прежнему сохраняя высокий темп экстенсивного развития, позволил приступить к решению принципиально новых задач, представляющих первостепенный интерес для молекулярной биологии. Основная, если не единственная, причина наметившегося качественного роста возможностей кристаллографии белков связана с использованием вместо излучения рентгеновских трубок синхротронной радиации.

Переход к новому источнику рентгеновского излучения ослабил требования, предъявляемые к размерам кристаллов, что особенно важно в структурном анализе высокомолекулярных белков и сложных комплексов, имеющих крупные элементарные ячейки. Сплошной спектр синхротронной радиации и легкость выбора любой длины волны монохроматического излучения сделали возможным подойти к решению фазовой проблемы и разработать метод мультиволновой аномальной дифракции, требующий для решения фазовой проблемы лишь одного кристаллического образца. Существенным дополнением к этому методу стал генно-инженерный способ получения в ауксотрофных клетках аминокислотных последовательностей, в которых все остатки метионина заменены на селенометионин. Использование [Se-Met]-белков не только освобождало

метод рентгеноструктурного анализа от длительной рутинной процедуры приготовления нескольких изоморфных белковых производных тяжелых атомов, но практически сняло проблему изоморфизма. И, наконец, применение в кристаллографии белков синхротронной радиации, несравненно более мощного излучения рентгеновской трубки, снизило, по крайней мере, на два-три порядка время экспозиции. Значение этого факта трудно переоценить, так как для установления трехмерных структур на атомном уровне впервые стали допустимыми промежуточные соединения физиологических реакций. Если до недавнего времени рентгеноструктурный анализ являлся фактически единственным прямым методом исследования нативных конформаций белковых молекул с атомным разрешением, то сейчас он становится источником (также единственным) столь же детальной информации о пространственном строении промежуточных соединений.

Таким образом, ближайшие перспективы экспериментального изучения пространственного строения белков, если судить по наметившейся тенденции, будут определяться достижениями в использовании синхротронной радиации. Существенных результатов можно ожидать от совместного применения рентгеноструктурного анализа белков с методами малоуглового рассеяния, криомикроскопии и многочисленными методами молекулярной спектроскопии. Среди последних ценен метод ЯМР, быстро прогрессирующий в последнее десятилетие. Его применение на гетероатомах и использование трехмерной спектроскопии ЯМР привело к упрощению анализа спектров и повышению его информативности в исследовании сложных структур.

1.3. СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БЕЛКА

Влияние, которое оказали результаты рентгеноструктурного анализа белков на изучение их фракций, детально рассматривается в следующем томе настоящего издания. Здесь хотелось бы обратить внимание на то, что наличие уже в течение нескольких десятилетий уникальной структурной информации все еще не привело к концептуальному развитию или переосмыслению представлений о природе и принципах функционирования белков, сложившихся до становления кристаллографии макромолекул. Ставшие доступными данные рентгеноструктурного анализа о пространственном строении белковых молекул не вызвали качественных изменений в понимании биокатализа, гормон-рецепторных взаимодействий и многих других явлений. Функционирование биосистем молекулярного уровня не обрело строгой трактовки в рамках сформулированных ранее концепций ферментативных и иных реакций, равно как и последние не получили на основе структурных данных своей объективной оценки. По-прежнему, фундаментальные различия между обычными химическими реакциями в растворе и реакциями, осуществляемыми ферментами, продолжают видаться в напряжении и деформации субстрата при его сорбции в активном центре в сторону переходного состояния, в индуцированном соответствии и принудительных конформационных изменениях фермента, в его изна-

чальной или приобретаемой в процессе катализа неравновесности и т.д. Появление данных рентгеноструктурного анализа белков не изменило традиционной направленности энзимологических исследований "от функции к структуре" или "от сложного к простому". И это не случайно.

Отмечая редуccionистский характер биологических исследований, А. Эддингтон в 1958 г. писал, что согласно общепринятой точке зрения "все, достойное внимания науки, может быть открыто лишь путем рассеечения объектов на микроскопические части" [6. С. 103]. Действительно, достигнутые в последующие десятилетия молекулярной биологией успехи оказались столь впечатляющими, что и сейчас цель проводимых исследований почти повсеместно отождествляется с "рассечением объектов на микроскопические части". Между тем, за это время ситуация претерпела качественные изменения, вызванные, прежде всего, развитием биологии молекулярного уровня. В немалой степени этому способствовали результаты рентгеновского анализа белковых молекул.

Кристаллическая структура белка – это очень сложным образом полученная и, по-видимому, самая дорогая во всех отношениях фотография. Представленное на ней изображение позволяет увидеть многие детали внутреннего устройства белковой глобулы. Но, как и любая другая фотография, она не раскрывает природы внутренних связей и принципы организации изображенного объекта, его возможного поведения при изменении внешних условий. Кристаллография белка – это морфология биосистемы молекулярного уровня. Для перехода к изучению физиологии белка одной фотографии кристаллической структуры белка, т.е. одной морфологии, недостаточно. На приведенной ниже схеме показана цепочка субординационных взаимоотношений между функцией белка (в данном случае, фермента) и его химическим и пространственным строением. Из схемы видно, что наблюдаемая структура белковой молекулы не имеет непосредственной связи с реализуемой каталитической функцией. Существующая же связь, во-первых, направлена не от функции к структуре, а от структуры к функции, т.е. в сторону, противоположную традиционному направлению поиска, и, во-вторых, включает три промежуточных звена и требует последовательного решения трех задач.



Первая задача заключается в изучении структурной организации и создании теории, устанавливающей логическую и количественную взаимосвязь между аминокислотной последовательностью и пространственной структурой белка, предсказывающей его конформационные и электронные свойства. Цель следующей задачи состоит в изучении физико-химических свойств белка и, основываясь на знании не только геометрии, но и структурной организации белковой молекулы, выявлении принципов ее функционирования, иными словами, разработке теории структурно-функциональной организации белка. Третья задача направлена на создание общей теории рассматриваемой функции (здесь биокаталитической), учитывающей решения предшествующих задач, особенности ферментативного катализа, физико-химические основы этого явления и возможности современного естествознания.

Работа по установлению структурной организации белка проводится обычно с помощью двух эмпирических подходов, дополняющих друг друга и имеющих единую цель. В рамках одного из них задачу стремятся решить, пытаясь предсказать нативную конформацию белка по известной аминокислотной последовательности, в рамках другого – воспроизвести механизм формирования этой конформации по ходу рибосомного синтеза в условиях *in vivo* или исходя из состояния флуктуирующего статистического клубка в условиях *in vitro*. Практически во всех исследованиях, отвечающих первому подходу, предпринимались (и продолжают предприниматься) попытки найти достаточно простые эмпирические корреляции между природой и последовательностью аминокислот, с одной стороны, и конформационными состояниями остатков в известных кристаллических структурах белков, с другой. В подавляющем большинстве работ эмпирические правила были выведены путем статистического анализа белков, изученных рентгеноструктурно. В ряде исследований привлечены термодинамические функции перехода спираль–клубок синтетических полипептидов, использованы атомные модели, стереохимические правила и экспериментальные данные физико-химических методов; есть исследования, в которых эмпирический подход сочетался с расчетом свёрхупрощенных моделей пептидной цепи.

Исследования механизма свертывания, отвечающие второму подходу к установлению структурной организации белка, базируются на многочисленных физических, химических и биологических методах исследования, которые дают прямую или косвенную информацию о геометрических, термодинамических и кинетических аспектах процессов денатурации и ренатурации, механизме клеточного синтеза аминокислотной последовательности и взаимодействия белковых цепей с шаперонами. В исследованиях этого плана, как и предшествующего, надежда возлагается на то, что в результате анализа экспериментальных данных в конечном счете удастся разработать эмпирические правила, позволяющие предсказывать по известному химическому строению белка основные этапы свертывания, в первом случае, и нативную пространственную структуру, во втором. Далее, предполагается, если эти цели будут достигнуты, то станет ясно не только как возникает физиологически активная конформация, но и почему она возникает, т.е. бу-

дуг понятия принципы структурной организации белковой молекулы.

Алгоритм предсказания трехмерных структур белка. Обзор основных работ, направленных на поиск эмпирических зависимостей между аминокислотными последовательностями и трехмерными структурами белков, был дан в предшествующем томе [2. Ч. II] и будет продолжен в гл. 17 этого тома. Анализ имеющегося материала привел к следующим выводам, относящимся ко всему циклу исследований этого направления.

1. В основе всех поисков предсказательных алгоритмов лежит конформационная концепция Полинга, согласно которой трехмерная структура белка представляет собой ансамбль регулярных вторичных структур. Позднее, развивая идею Полинга и Кори о взаимодействии вторичных структур, в конформационный ансамбль были включены супервторичные структуры. Единство всех исследований по отношению к этой концепции неизбежно, поскольку в противном случае очевидна бесперспективность поиска эмпирических корреляций и предсказательных алгоритмов, базирующихся на статистической обработке известных кристаллографических данных. Если основу пространственного строения сложных белковых макромолекул образуют не только отдельные немногочисленные стандартные блоки, но и практически неограниченное количество разнообразных нерегулярных структурных сегментов, то, очевидно, нельзя рассчитывать на его описание с помощью простых правил, выведенных путем статистической обработки всегда ограниченного экспериментального материала. Результаты рентгеноструктурного анализа свидетельствуют о том, что общее содержание вторичных форм полипептидной цепи в белках сравнительно невелико, во всяком случае его доверительное значение не превышает 50%. Реализующиеся в нативных конформациях белковых молекул α -спирали и β -структуры в действительности не являются, более того, у гетерогенных аминокислотных последовательностей никогда не могут являться, строго регулярными (отклонения соответствующих двугранных углов (φ , ψ) от их значений в гомогенной цепи составляют, как правило, десятки градусов, а иногда достигают 100–120°). Анализ также показал, что все стандартные аминокислотные остатки (за исключением Pro) имеют практически одинаковые возможности для встраивания в α -спираль, β -структуру и неупорядоченные участки. Выбор определяется не индивидуальными свойствами остатков, а их комбинацией в последовательности.

Таким образом, имеющийся экспериментальный материал однозначно указывает на несостоятельность традиционного представления о пространственной организации глобулярных белков как ансамбля регулярных форм и на отсутствие общности в столь же распространенной искусственной классификации белковых структур на вторичные, супервторичные и третичные. Этот вывод, разумеется, не ставит под сомнение сам факт наличия в конформациях белков локальных структур основной цепи, в той или иной мере обладающих регулярностью.

2. Почти все эмпирические исследования структурной организации белка базируются на гидрофобной концепции Козмана, согласно которой белковая глобула состоит из гидрофильной внешней оболочки и гидро-

фобного ядра. "Одним из важнейших факторов, направляющих свертывание полипептидной цепи, – пишут авторы одной фундаментальной монографии, – является расположение полярных и неполярных боковых групп. По мере синтеза белка его многочисленные гидрофобные боковые группы стремятся собраться внутри белковой глобулы, что позволяет им избежать контакта с водным окружением (точно так же сливаются механически диспергированные в воде капельки масла). В то же время все полярные группы стремятся расположиться на поверхности молекулы белка, где они могут взаимодействовать с водой и другими полярными группами" [7. С. 133]. Не отрицая существования самого явления гидрофобности и развитого Козманом представления об энтропийной сущности гидрофобных взаимодействий и наличия противоположных тенденций в поведении полярных и неполярных атомных групп в водном окружении, можно тем не менее утверждать, что описанная выше модель структурной организации белка абсолютно нереальна, так же как некорректно сопоставление свертывания белковой цепи с коагуляцией диспергированных капель масла или фосфолипидов клеточных мембран. Дисперсные частицы, образующие масляные капли, и молекулы фосфолипидов с четко выраженными полярными головками и гидрофобными хвостами свободны и поэтому в состоянии реализовать свое стремление собраться таким образом, чтобы свести контакты своих гидрофобных групп с водой к минимуму. Полярные и неполярные атомные группы боковых цепей и пептидные группы основной цепи белка не свободны и поэтому не могут следовать своим тенденциям и располагаться раздельно. Сказанное находится в полном согласии с экспериментом. Статистический анализ местонахождения различных аминокислот во внутренних областях и на поверхности глобул у нескольких десятков белков известного пространственного строения не обнаружил различий в распределении так называемых полярных и неполярных остатков [8]. Кроме того, по отношению к аминокислотным остаткам крайне условно само такое разделение, так как во многих из них полярные и неполярные атомные группы входят в одну боковую цепь и, следовательно, валентно связаны друг с другом.

Таким образом, структурная организация глобулярных белков не отвечает модели с гидрофобным ядром и гидрофильной оболочкой, а эффект гидрофобных взаимодействий не может быть использован для вывода полезных коррекций.

3. Общая для всех исследований рассматриваемого направления особенность состоит в стремлении авторов или вообще избежать, или крайне упростить учет взаимодействий даже между двумя соседними по цепи аминокислотными остатками. При эмпирическом подходе это неизбежно, поскольку признание значительной роли в формировании структуры белка межостаточных взаимодействий и порядка расположения аминокислот в цепи равносильно отказу от поиска простых корреляций. Действительно, при огромном множестве возможных комбинаций как аминокислотных остатков в последовательности, так и конформационных состояний каждого остатка количество подлежащих рассмотрению структурных вариантов настолько велико, что для их корректной статистической обработки было бы недостаточно опытных данных о нативных структурах

всех имеющихся в природе белков. Эта ограниченность статистического и любого другого эмпирического подхода является принципиальной. Она не оставляет никаких надежд на возможность решения таким путем задачи структурной организации белка в будущем, при накоплении большего экспериментального материала.

4. При эмпирическом подходе и обсуждении пространственного строения белковых молекул речь всегда идет лишь о конфигурации полипептидной цепи при полном игнорировании конформационных возможностей боковых цепей аминокислотных остатков. Между тем, именно взаимодействия боковых цепей, в которые входят около двух третей атомов молекулы белка, ответственны в наибольшей степени за стабилизацию и уникальные физические и биохимические свойства нативной конформации природной гетерогенной аминокислотной последовательности. В силу этого обстоятельства на локальных участках белковой цепи в зависимости от аминокислотного порядка возможна реализация самых разнообразных структур, причем, главным образом, нерегулярных. Представление о том, что у гетерогенной последовательности наиболее компактными, энергетически предпочтительными во всех случаях оказываются только структуры с регулярной основной цепью, не подкрепляется физическими соображениями общего характера, противоречит экспериментальным данным и результатам теоретического анализа. У белков с нерегулярным расположением вдоль цепи боковых радикалов пространственные структуры с регулярными формами основной цепи, очевидно, не могут во всех случаях обеспечить максимальное число эффективных внутримолекулярных контактов, а поэтому не могут быть всегда самыми стабильными.

Так как при статистическом анализе невозможно учесть взаимодействия боковых цепей и определить их конформации, то и нельзя на основе эмпирического подхода прийти к пониманию принципов пространственной организации белковой молекулы. Ведь именно сложнейшая, строго упорядоченная, однако не сводящаяся к регулярной, система взаимодействий боковых цепей специфична для каждого природного аминокислотного порядка, а поэтому только она и ответственна за практически беспредельное многообразие трехмерных структур белковых молекул и их динамических конформационных свойств. Реализующееся пространственное строение белка определяется конкретной аминокислотной последовательностью. В силу уникальности последней ее нативная геометрия непредсказуема на основе среднестатистических характеристик уже изученных белков. Вероятностный подход адекватен синтетическим полипептидам, строение и свойства которых статистичны и описываются равновесной термодинамикой и статистической физикой. Белок же в физиологических условиях однозначно детерминирован как в отношении своих конформационных свойств, так и функции, и должен являться объектом рассмотрения нелинейной неравновесной термодинамики.

5. Наконец, исследования структурной задачи проблемы белка с помощью эмпирического подхода объединяет единая стратегия поиска решения. Она заключается в том, чтобы на первом этапе предсказать, используя эмпирические корреляции, регулярные участки полипептидной цепи белка. Затем, оперируя идентифицированными фрагментами как

твердыми телами, построить грубую модель всей макромолекулы и уточнить ее путем минимизации энергии при вариации конформационных степеней свободы. Однако по причинам, указанным выше, невозможно не только создать совершенный предсказательный алгоритм, но и при наличии последнего (чисто гипотетический случай) получить удовлетворительное для минимизации начальное приближение, а имея его — проминимизировать с учетом всех переменных.

Итак, можно констатировать, что у всех исследований, направленных на разработку эмпирических предсказательных алгоритмов трехмерных структур белка, неадекватными изучаемому явлению оказываются и положенные в их основу спиральная концепция Полинга—Кори, и гидрофобная концепция Козмана об организации нативной конформации, и используемые методы, и выбранная стратегия решения задачи. Такой путь следует считать бесперспективным, так как он в принципе, а не из-за сложности проблемы или недостатка экспериментального материала, не может привести к конечной цели — априорному количественному описанию геометрии и конформационных возможностей остатков в белковой глобуле. Не может играть он и вспомогательную роль, например, в получении промежуточных данных о структуре или ее отдельных частей, которые были бы полезны в последующем уточнении. Бесперспективность эмпирического подхода подтверждают результаты всех принятых за последние три десятилетия попыток следовать ему.

Свертывание белковой цепи. Для познания принципов структурной организации белковых молекул чрезвычайный интерес представляет явление денатурации (ренатурации). Переход нативной конформации белка в развернутую неструктурированную форму и обратный переход флуктуирующего статистического клубка в исходную компактную трехмерную структуру есть не что иное, как процессы разрушения и формирования именно тех самых связей, которые и обуславливают структурную организацию белковой молекулы. Анализ работ, посвященных экспериментальным и теоретическим исследованиям денатурации белков, был начат в предшествующем томе [2. Ч. III]. Перед тем как продолжить эту тему, кратко напомним основные итоги уже проведенного обсуждения.

Изучение структурной самоорганизации позволило сформулировать фундаментальное положение о том, что конформация белковой молекулы отвечает термодинамически равновесному состоянию и, как таковое, не зависит от конкретных внешних условий свертывания белковой цепи (*in vivo*, *in vitro* или с помощью шаперонов) и от ее предыстории, т.е. способа получения (биосинтез или химический синтез). Конечная пространственная структура определяется исключительно составом и порядком расположения аминокислот в последовательности. Было доказано, что все необходимые сведения о физиологически активной форме белка заключены в его химическом строении. Трансляция линейной информации в трехмерную структуру возможна, однако только при вполне определенных физиологических условиях (температура, давление, pH, ионная сила, присутствие простетических групп, ионов металла). При их соблюдении сборка осуществляется спонтанно в том смысле, что принятие белком своей равновесной нативной конформации не требует специального

морфогенетического молекулярного аппарата, подобного тому, какой необходим, например, для включения двойной спирали ДНК в нуклеосому.

Дать трактовку механизма свертывания белковой цепи из состояния статистического клубка в строго детерминированную трехмерную структуру – это значит ответить на следующие вопросы:

1. Каковы побудительные мотивы самопроизвольно протекающего процесса сборки природной аминокислотной последовательности в нативную конформацию или, иными словами, какие силы управляют процессом?

2. Каким образом совершенно беспорядочные случайные конформационные флуктуации белковой цепи (вращение вокруг ординарных связей) спонтанно и безошибочно приводят к созданию всегда одной и той же у данной последовательности определенной трехмерной структуры белка?

3. Почему столь мала продолжительность сборки нативной конформации белка, осуществляемой по беспорядочно-поисковому механизму, казалось бы неизбежно связанному с перебором практически бесконечного массива конформационных флуктуаций?

Начиная с исследований М. Ансона и А. Мирского 1930-х годов и по сегодняшний день, т.е. в течение более 60 лет, предпринималось множество попыток ответить на поставленные вопросы. Для оценки полученных результатов приведу совсем недавние высказывания ряда известных специалистов. Так, Е. Лэттман и Г. Раузе в работе 1993 г. следующим образом характеризуют состояние проблемы свертывания белка: "Несмотря на интенсивные исследования, обобщенное физическое понимание процесса свертывания остается туманным, а сама проблема свертывания белка, т.е. понимание того, как аминокислотная последовательность определяет трехмерную структуру, еще ждет своего решения... Эта проблема предстает как один из наиболее значимых научных вызовов XX века" [9, С. 439]. Аналогичные мнения имеют такие авторитеты в этой области, как Т. Крейтон и А. Фершт. Первый полагает, что наука по существу еще не приблизилась к решению проблемы свертывания белка [10], а второй, отмечая сложность проблемы и называя ее даже "устрашающей задачей" ("daunting task"), в 1993 г. писал: "Выявление принципов, управляющих свертыванием, предполагает громадную нерешенную проблему, поскольку еще невозможно рассчитать de novo путь свертывания белка или даже выяснить, является ли известная структура стабильной" [11, С. 5].

Отсутствие серьезного прогресса вплоть до начала 1980-х годов можно было объяснить неразработанностью теоретических основ изучения процессов структурообразования, протекающих в открытых системах вдали от положения равновесия; речь идет о целой области естественнонаучных знаний – нелинейной неравновесной термодинамики или физики статистико-детерминистических процессов. Немалую роль, по-видимому, играл и психологический барьер, возникающий всякий раз при встрече с уникальным, не имеющим аналогий и, следовательно, требующим нетрадиционного подхода, явлением, каким, безусловно, является спонтанное возникновение трехмерной структуры белка. Подход, до последнего времени используемый в изучении механизма свертывания, имеет следующие характерные черты принципиального порядка.

1. В разработанных моделях процесс структурной самоорганизации белков принимается термодинамически обратимым двухфазным переходом первого рода. Его описание основывается на равновесной термодинамике (статистической физике) и формальной кинетике, конкретно, на термодинамической теории двух состояний Дж. Брандтса [12, 13]. Свертывание белковой цепи представляется (что неизбежно при чисто статистической трактовке) равновесным процессом последовательного увеличения содержания микросостояний трехмерной нативной структуры белка при одновременном точно таком же уменьшении содержания микросостояний альтернативной исходной структуры – флуктуирующего клубка. Полагают, что все промежуточные макросостояния наделены только чертами начального и конечного равновесных состояний, непосредственно и быстро переходящих друг в друга в соответствии с направленностью процесса и при отсутствии заметных количеств промежуточных метастабильных продуктов. Однако, поскольку рассмотрение всех явлений спонтанного зарождения порядка из беспорядка находится вне компетенции равновесной термодинамики и статистической физики, то любая трактовка на этой основе свертывания белковой цепи в принципе не может вскрыть побудительных мотивов возникновения и развития процесса самоорганизации высокоупорядоченной структуры из хаотического состояния, его направленности, высокой скорости и обратимости. Такое описание противоречит также многим известным опытным фактам, касающимся строения промежуточных продуктов самосборки белка и кинетики реальных процессов ренатурации.

2. Во всех предложенных равновесных термодинамических моделях важнейшей характеристикой упорядоченного состояния белка считается глобулярность его нативной конформации с внутренним гидрофобным ядром и внешней гидрофильной оболочкой. Такое укоренившееся представление имеет, как уже отмечалось, мало общего с действительными трехмерными структурами белков в отношении как пространственной формы, так и характера распределения в глобуле аминокислотных остатков, в значительной мере искусственно подразделяемых на полярные и неполярные. Чтобы избежать рассмотрения неподдающихся учету при данном подходе гетерогенности белковой цепи и неравномерности упаковки аминокислотных остатков в нативной конформации, глобула предполагается структурно гомогенной, что не отвечает реальной ситуации.

3. Предложенные модельные описания механизма свертывания белка неполны, непоследовательны и противоречивы. Они, по существу, не отвечают ни на один из принципиальных вопросов, возникающих при изучении уникального в природе молекулярного явления самопроизвольного зарождения и развития порядка из хаоса. Для приближения конечных результатов теоретического рассмотрения процессов сборки к наблюдаемым экспериментальным данным в расчеты привносятся (без объяснения причин и механизма возникновения) никак не следующие из статистической физики и равновесной термодинамики представления об эмбрионах, ядрах и нуклеациях или вводятся известные из опыта структурные элементы нативных конформаций белков, как правило, α -спирали и β -складчатые листы.

Главный вывод, который можно сделать как из общих соображений, так и анализа теоретических разработок, заключается в принципиальной несовместимости спонтанного, быстрого и безошибочного свертывания беспорядочно флуктуирующей белковой цепи в строго детерминированную трехмерную структуру, с одной стороны, и используемого для изучения этого явления аппарата классической равновесной термодинамики и формальной кинетики, с другой. Ни в одной работе по моделированию процесса структурной самоорганизации белка не обращено внимание на "противоестественность", с точки зрения этого аппарата, самого феномена спонтанного возникновения высокоупорядоченной структуры из беспорядка.

Исследования денатурации (ренатурации) белков, проведенные в последние годы, не внесли качественных изменений в понимание самопроизвольного процесса свертывания белковой цепи и состояния структурной организации белковой молекулы. Поставленные выше вопросы так и остались без ответов, о чем говорят недавно опубликованные обзоры [9–11, 14, 15]. Развитие этой области в конце 1980 – начале 1990-х годов в теоретическом отношении свелось к некоторому обновлению научного словаря и появлению ряда гипотетических схем, мало что добавивших к уже существовавшим моделям. Особенно оживленно обсуждаются в литературе модель гидрофобного схлопывания (hydrophobic collapse) и каркасная модель (framework model).

Гидрофобная модель основывается на предположении, что по ходу свертывания белковой цепи в центре флуктуирующего клубка возрастает концентрация гидрофобных остатков [16–18]. В рамках этих представлений наиболее популярной трактовкой механизма самоорганизации белка является в настоящее время гипотеза так называемой расплавленной глобулы (molten globule) [19–21]. Ее основные положения сводятся к следующим:

а) самоорганизация белковых молекул проходит во времени через несколько стадий, так что на каждой последующей стадии формируется все более сложная и все менее флуктуирующая структура; б) флуктуирующие зародыши той или иной структуры, сформированные на каждой стадии, направляют формирование более сложной и более стабильной структуры на следующей стадии; в) результаты, полученные на каждой стадии, не переделываются, а лишь закрепляются на последующих стадиях. Выделяют, как правило, три стадии самоорганизации. На первой стадии в развернутой белковой цепи образуются за счет гидрофобных взаимодействий флуктуирующие зародыши вторичной структуры. Когда число их достигает критического значения, происходит переориентация боковых цепей, резкое снижение энергии невалентных взаимодействий и быстрый переход (схлопывание) белковой цепи в новое, более компактное конформационное состояние – расплавленную глобулу (вторая стадия сборки), которая по своим размерам и форме близка нативной структуре и отличается от нее главным образом лишь неспецифическими взаимодействиями аминокислотных остатков с окружающей средой. И, наконец, на третьей стадии формируется уникальная конечная конформация белковой молекулы путем подстройки промежуточной компактной структуры.

Определение ее как расплавленной глобулы, совпадающей с нативным состоянием по вторичной структуре и топологии укладки основной цепи, но отличающейся от него отсутствием плотной упаковки боковых групп, представляется неудачным и по своей форме, и по содержанию. Первое становится очевидным, если поставить вопрос, имеющий отношение не только к самому термину, но и ко всей гипотезе: можно ли вообразить свертывание белковой цепи вне процесса, вне прохождения через ряд промежуточных состояний, и может ли одно из них не быть близко к нативному состоянию? Очевидно, это очень трудно, так же трудно, как, например, представить отсутствие сходства между близким к завершению строящимся зданием и его окончательной архитектурой. Определение расплавленной глобулы неправильно также по существу, поскольку ее вторичные структуры и форма основной цепи молекулы не могут сколь-нибудь близко подойти к нативной структуре без предварительного установления строго детерминированных контактов между подавляющим большинством внутренних боковых цепей, ибо именно этот вид взаимодействий обуславливает структурные особенности каждой природной аминокислотной последовательности.

Имеется еще одно возражение против гипотезы о расплавленной глобуле, использующейся вместе с аппаратом равновесной термодинамики и формальной кинетики для объяснения экспериментальных фактов. Конкретной теоретической основой интерпретации данных о денатурации служит термодинамическая теория двух состояний Брандтса [12, 13]. Как уже отмечалось, белковая молекула в растворе, согласно этой теории, может быть представлена большим количеством микросостояний. Все они входят в состав либо распределения N (нативное макросостояние белка), либо D (денатурированное макросостояние). Теория Брандтса сделала возможным относительно простой термодинамический анализ конформационного перехода $N \rightarrow D$ в предположении, что реализующиеся микросостояния не являются чем-то вновь созданным, а присутствуют в распределении N и D. Это означает, что в теории постулируется отнюдь не очевидное положение об отсутствии новых промежуточных конформационных состояний в области перехода $N \rightarrow D$. Следовательно, главный критерий справедливости теории двух состояний Брандтса состоит в требовании отсутствия максимумов, минимумов и потенциальных ям в наблюдаемых изменениях энтальпии и энтропии при переходе от D к N (и наоборот). Иными словами, если образование трехмерной структуры белка происходит, как того требует теория двух состояний, путем постоянного усложнения и приближения к нативному состоянию, то изменения энтальпии, энтропии и свободной энергии по ходу ренатурации должны быть монотонными. Отсутствие экстремумов означает отсутствие между нативной структурой и статистическим клубком метастабильных промежуточных состояний. Механизм сборки белка проходит в этом случае в одну стадию. А теперь обратимся вновь к обсуждаемой гипотезе о расплавленной глобуле в которой постулируется образование на пути к нативной структуре близкое к ней промежуточное состояние. При существовании достаточно устойчивых обнаруживаемых экспериментально интермедиатов зависимости изменений энтальпии, энтропии и свободной

энергии по ходу свертывания должны в этом случае содержать экстремумы, т.е. не быть монотонными. В то же время во всех положениях гипотезы подчеркивается последовательный характер усложнения структуры в течение всего процесса самосборки. Возникшие на ранних стадиях вторичные и иные конформационные состояния направляют формирование более сложной и стабильной структуры, которые не переделываются, а лишь закрепляются на последующих стадиях. При такой организации глобулы зависимости энтальпии, энтропии и свободной энергии непременно должны быть монотонными, что свидетельствует об отсутствии метастабильных промежуточных соединений. Только что приведенное соображение о характере процесса самоорганизации белка, по существу, является формулировкой главного критерия сборки белка по одностадийному механизму, описываемому теорией двух состояний Брандтса ($N \rightleftharpoons D$). Следовательно, гипотеза о расплавленной глобуле одновременно декларирует два взаимоисключающих тезиса – наличие и отсутствие метастабильного промежуточного состояния, многостадийный и одностадийный механизм самоорганизации белковых молекул, т.е. является не только чисто умозрительной натурфилософской концепцией, но и внутренне противоречивой. Кроме того, она не оригинальна. Подобное и столь же умозрительное описание было сделано В.И. Лимом около 20 лет назад [22].

Не более оригинальна и каркасная модель сборки белка, базирующаяся на постулате, непосредственно следующем из концепции Полинга–Кори о якобы энергетической предпочтительности регулярных вторичных структур, которые в связи с этим должны играть центральную роль в определении пути структурирования белковой цепи. Предполагается, что процесс сборки начинается с появления изолированных и на первых порах изменчивых вторичных структур ("мерцающих кластеров"). Взаимодействуя друг с другом, они вытесняют молекулы воды, стабилизируют свои структуры и посредством гидрофобных взаимодействий образуют единый, достаточно жесткий каркас третичной структуры [23, 24]. Близкое и столь же умозрительное представление о свертывании белковой цепи заложено в так называемой диффузионно-коллизийной модели [25, 26]. Аналогичные по существу механизмы сборки белка рассматривались также в работах [27, 28].

Важнейшим достижением в изучении механизмов структурной организации белков явились экспериментальные исследования Крейтона 1970–1980-х годов, особенно его работы, посвященные эмпирическому подходу к изучению промежуточных состояний обратимой денатурации цистинсодержащих белков [29, 30]. Разработанные Крейтоном методы позволяют идентифицировать дисульфидные связи, регулировать скорость их образования и разрушения и по последовательности возникающих промежуточных моно-, ди- и т.д. S–S-продуктов следить за ходом свертывания белковой цепи. Предпринятое им на этой основе исследование пути свертывания панкреатического трипсинового ингибитора [29] опережает и сейчас, по прошествии двух десятилетий, научный уровень аналогичных работ по ренатурации других белков. Подход Крейтона, однако, неприемлем для белков, лишенных S–S-мостиков.

Долгое время белки, не содержащие остатков Cys, вообще считались неподходящими объектами изучения механизма свертывания. Ситуация начала меняться во второй половине 1980-х годов в связи с разработкой А. Ферштом еще одного варианта эмпирического подхода [11], который после необходимой коррекции может обрести значительный научный потенциал [2]. Подход универсален в изучении структуры и стабильности конечных и промежуточных состояний белковой цепи вне зависимости от присутствия остатков Cys. Он включает целый комплекс различных экспериментальных методов, но своим появлением обязан становлению в начале 1980-х годов генной инженерии, сделавшей доступными практически любые полипептидные последовательности стандартных аминокислот. В результате появилась возможность иметь сколь угодно представительный набор искусственных белковых аналогов, отличающихся от природного объекта числом и местом аминокислотных замен. Такие сайт-специфические белковые мутанты могут служить инструментами или зондами, позволяющими получать тонкую структурную информацию о процессе самоорганизации белка, недоступную никаким другим путем. Появление вместо одного объекта исследования набора целенаправленно модифицированных аналогов повышает интерпретационные возможности многих экспериментальных методов (ЯМР- и КД-спектроскопии, методов остановленной струи, изотопного обмена и др.), особенно при их комплексном использовании.

Разработанный Ферштом эмпирический подход к изучению термодинамических и кинетических аспектов свертывания белковой цепи с привлечением сайт-направленного мутагенеза позволил автору и сотрудникам проанализировать все этапы формирования трехмерной структуры белка (барназы), не содержащего дисульфидных связей [31–33]. Изучение обратимой денатурации начинается с тщательного визуального анализа трехмерной структуры белка с целью выявления остатков, которые предположительно могут играть важную роль в структурной стабилизации и кинетике свертывания. Следующий этап заключается в модификации потенциально важных для сборки межостаточных взаимодействий путем специальных химических изменений белковых цепей актуальных остатков и сайт-направленного мутагенеза. Завершается этап составлением оптимального набора и его синтеза методами генной инженерии. Далее проводятся термодинамические и кинетические экспериментальные исследования механизма ренатурации (денатурации) нативного белка и мутантов, определения констант равновесия, констант скорости и величин изменений свободной энергии Гиббса стабильных структур, промежуточных и переходных состояний. Найденные значения используются для построения энергетических профилей путей свертывания белковых цепей дикого и мутантного типов. На их основе определяются разностные энергетические диаграммы, которые показывают различия в уровнях энергии всех состояний на пути свертывания белка и мутантов. Реализация описанной процедуры приводит к эмпирическим зависимостям между важными для свертывания белковой цепи взаимодействиями боковых цепей и параметрами, по мысли Фершта, характеризующими кинетику, равновесное состояние и механизм ренатурации [11]. Каждая мутация, которая в

рассматриваемом методе отличается от дикого типа одной атомной группой у одного аминокислотного остатка, позволяет, считает автор, количественно оценить ее парциальное воздействие на скорость свертывания и стабильность трехмерной структуры белка.

Исследование процесса ренатурации барназы Ферштом и соавт. [31–33] (как и панкреатического трипсинового и ингибитора Крейтоном [29, 30]) подробно изложено во втором томе издания "Проблема белка" [2. Ч. III]. Анализ результатов привел к заключению, что первая попытка воссоздать на уровне отдельных аминокислотных остатков количественную картину всего пути свертывания белка, не содержащего дисульфидные связи, не достигла желаемой цели. Декларированный Ферштом порядок ренатурации не является неизбежным следствием объективного рассмотрения, а представляет собой один из многих правдоподобных вариантов. Принципиальное возражение заключается в несоответствии равновесной термодинамики и формальной кинетики – теоретической основы эмпирического подхода Фершта – сугубо неравновесному характеру процесса структурной самоорганизации белка.

Глава 2

ТЕОРИИ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКА

За последние два десятилетия естествознание сумело приблизиться к пониманию явлений спонтанного возникновения высокоупорядоченных структур во многих самых разнообразных физических, химических и биологических открытых системах. Было осознано существенное различие в природе равновесных и неравновесных процессов, выработан новый взгляд на случайность и необходимость, разработаны теория диссипативных самоорганизующихся структур и теория бифуркаций – обратимых флуктуаций, играющих конструктивную роль в возникновении порядка из хаоса. Это стало возможно благодаря созданной главным образом трудами И. Пригожина и его школы нелинейной неравновесной термодинамики. Открывшиеся новой наукой перспективы необычайно широки и многообещающи. Ее общие положения о процессах самоорганизации в открытых диссипативных системах, классических и квантовых, биологических и неорганических, легли в основу исследований во многих областях естествознания и гуманитарных наук. Становление нелинейной неравновесной термодинамики привело к качественным изменениям таких фундаментальных понятий в физике, как время и динамика.

Идеи и методы науки о спонтанном возникновении структур и их эволюции, естественно, имели большой резонанс в биологии. Особенно быстрое и широкое использование они нашли в исследованиях клеточных

и надклеточных систем, дифференцировки клеток и ряда других проблем [34, 35]. В работах М. Эйгена, отмеченных Нобелевской премией, впервые была сформулирована концепция отбора и эволюции биологических макромолекул из неупорядоченных систем [36]. Она основана на теории гиперцикла как одного из принципов структурной самоорганизации. Тем самым была доказана непротиворечивость, по крайней мере, на элементарном уровне, эволюционных концепций физики и биологии. Пожалуй, впервые в истории науки вопросы зарождения жизни, отбора и эволюции были рассмотрены теоретически, хотя и сугубо качественно, с общей чисто физической позиции.

Если же обратиться к проблеме белка – главному предмету нашего рассмотрения, то приходится констатировать, что становление нелинейной неравновесной термодинамики прошло практически незамеченным для составляющих эту проблему задач, в том числе задачи структурной организации белковых молекул – исходной в логической цепочке, связывающей строение белка с его функцией и структурами надмолекулярных систем. Между тем предпринимаемые уже в течение трех десятилетий попытки подойти к решению вопроса, используя эмпирические подходы, равновесную термодинамику и формальную кинетику, неизменно терпят неудачу. Оставаясь нерешенной, структурная задача сдерживает рассмотрение всех последующих и создание теоретической молекулярной биологии – науки, столь же необходимой для понимания процессов жизнедеятельности, как молекулярная физика и квантовая химия для трактовки физических и химических свойств органических и неорганических низкомолекулярных соединений. А. Сент-Дьердьи писал: "Мы действительно приблизимся к пониманию жизни только тогда, когда наши знания обо всех структурах и функциях на всех уровнях – от электронного до надмолекулярного – сольются в единое целое", и далее: "...одним из основных принципов жизни является организация; мы понимаем под этим, что при объединении двух вещей рождается нечто новое, качества которого не адекватны и не могут быть выражены через качества составляющих его компонентов" [37. С. 11–12].

Автор данной монографии впервые попытался решить задачу структурной организации белка на атомном уровне с помощью нелинейной неравновесной термодинамики [38, 39]. С этой целью были разработаны соответствующие теории и методы, перечисленные ниже и обсуждаемые в остальной части книги.

1. Бифуркационная теория свертывания белка, в рамках которой нашли трактовку важнейшие особенности структурной самоорганизации белковой цепи: беспорядочно-поисковый и статистико-детерминистический механизм сборки аминокислотной последовательности, самопроизвольный характер возникновения и протекания всех стадий образования высокоупорядоченной трехмерной структуры, высокая скорость свертывания цепи и безошибочность процесса [40].

2. Физическая теория структурной организации белка, связывающая его трехмерную структуру с аминокислотными остатками последовательности, т.е. макроскопические конформационные свойства белковой цепи со свойствами ее микроскопических составляющих [41].

3. Метод конформационного анализа белка, базирующийся на отмеченных выше теориях и позволяющий рассчитывать по известной аминокислотной последовательности координаты атомов нативной конформации, ее возможные конформационные перестройки и механизм образования в условиях *in vivo* и *in vitro* [38, 41].

4. Теория и метод решения обратной структурной задачи, позволяющие целенаправленным и контролируемым образом изменять аминокислотную последовательность по заданной пространственной структуре [42].

2.1. БИФУРКАЦИОННАЯ ТЕОРИЯ СВЕРТЫВАНИЯ БЕЛКОВОЙ ЦЕПИ

Свертывание белковой цепи не может быть объектом рассмотрения классической равновесной термодинамики, поскольку последняя оперирует только усредненными характеристиками стохастических систем, обратимыми флуктуациями и функциями состояния, а поэтому ограничена изучением макроскопических систем с чисто статистическим, полностью неупорядоченным движением микроскопических частиц, взаимодействующих неспецифическим образом только в момент упругих соударений. Равновесная термодинамика в состоянии анализировать коллективное поведение множества частиц, не вдаваясь при этом в детали их внутреннего строения и не конкретизируя механизм равновесного процесса. Особенно важно отметить то обстоятельство, что для классической термодинамики все случайные флуктуации системы неустойчивы, обратимы и, следовательно, не могут оказывать заметного, а тем более конструктивного, воздействия на протекающие процессы. Все явления, самопроизвольно протекающие в изолированной системе, направлены, согласно термодинамике равновесных процессов, на достижение однородной системы во всех возможных отношениях. Сборка белка не отвечает основным положениям классической статистической физики: эргодической гипотезе и H-теореме Больцмана, принципу Больцмана о мультипликативности термодинамической вероятности и закону о равномерном распределении энергии по всем степеням свободы. Следование системой больцмановскому распределению вероятностей и больцмановскому принципу порядка, не содержащих механизма структурообразования из беспорядка, исключает саму возможность спонтанной сборки трехмерной структуры белка. Кроме того, невозможен перебор всех равноценных с точки зрения равновесной термодинамики и статистической физики конформационных вариантов. Даже у низкомолекулярных белков (менее 100 аминокислотных остатков в цепи) он занял бы не менее 10^{50} лет. В действительности же продолжительность процесса исчисляется секундами. Величина порядка 10^{50} лет может служить своеобразной количественной мерой удаленности предложенных в литературе равновесных термодинамических моделей от реального механизма свертывания природной аминокислотной последовательности.

Линейная неравновесная термодинамика, которая изучает процессы, протекающие недалеко от положения равновесия, также не может служить основой теории свертывания белковой цепи. К известным началам

равновесной термодинамики здесь дополнительно вводится ряд новых положений, уже не столь всеобъемлющих и строгих. Так, предполагаются постулированные Л. Онсагером линейность термодинамических уравнений движения и симметричность кинематических коэффициентов (принцип взаимности), а также соблюдение сформулированных И. Пригожиным принципов локального равновесия и минимума производства энтропии. Привлечение этих частных и несоблюдаемых строго при отходе от положения равновесия постулатов не ведет, однако, к расширению возможностей термодинамического подхода к объяснению механизма самоорганизации высокоупорядоченных структур. Изучение строится путем экстраполяции равновесного состояния, т.е. по-прежнему на основе усредненных термодинамических характеристик системы. Молекулярная специфика объекта учитывается лишь неявным образом через определяемые эмпирически кинематические коэффициенты.

Обратимся теперь к развитой И. Пригожиным нелинейной неравновесной термодинамике, важнейшими составными элементами которой являются, как отмечалось, теория диссипативных систем и теория бифуркаций [43]. К неперенным условиям возникновения упорядоченной структуры в диссипативной системе следует отнести, во-первых, наличие обмена с окружающей средой веществом и/или энергией; во-вторых, состояние системы должно находиться далеко от положения равновесия, где наблюдается нелинейность термодинамических уравнений движения, нарушение соотношения взаимности Онсагера и принципов локального равновесия и минимума производства энтропии Пригожина; в-третьих, отклонение системы от равновесного состояния не может быть представлено путем непрерывной деформации последнего и, следовательно, отнесено к одной термодинамической ветви. Это условие будет соблюдаться в том случае, если малые изменения на входе вызывают большие отклонения на выходе или, иными словами, когда значения градиентов соответствующих термодинамических параметров (температуры, давления, концентрации) превышают критические величины. И, наконец, в-четвертых, организация упорядоченной макроскопической структуры должна быть результатом как случайного, так и детерминистического кооперативного (согласованного, синергетического) движения микроскопических частиц.

Материальный и энергетический обмен диссипативной системы со средой (первое условие) происходит без нарушения второго начала термодинамики. В данном случае оно проявляется в более общем виде и относится к изолированной системе, в которую открытая диссипативная структура входит как подсистема. В отличие от самопроизвольных равновесных процессов, при протекании которых все части системы хаотизируются и, следовательно, вносят положительный вклад в общее увеличение энтропии, в нелинейных неравновесных процессах происходит диспропорционирование энтропии. Уменьшение энтропии при создании упорядоченной диссипативной структуры сопровождается одновременным увеличением энтропии остальной части изолированной системы. Второе условие означает невозможность описания диссипативной системы с помощью аппарата линейной термодинамики неравновесных процессов, а третье утверждает качественное отличие диссипативной структуры от равновесного

состояния, как и любого другого близкого к нему состояния. Четвертое условие отражает новизну диссипативных систем в отношении макроскопической динамики, определяемой избирательными взаимодействиями микроскопических частиц, их внутренним строением, наличием наряду с обратимыми, необратимых флуктуаций.

Как уже отмечалось, нелинейная неравновесная термодинамика возникла в результате синтеза статистики и детерминизма, случайности и необходимости, обратимости и необратимости, эволюционных концепций Больцмана и Дарвина, короче, синтеза термодинамики и статистической физики, изучающих макроскопическое проявление множественных ансамблей, и классической физики и квантовой механики, изучающих конкретные свойства и строение микроскопических составляющих и единичных тел. Такой синтез – это не просто конвергенция наук, а рождение качественно новой области знаний, которой впервые стали подвластны процессы спонтанного возникновения порядка из хаоса, разработка соответствующих теорий и расчетных методов.

Согласно теории диссипативных систем и теории бифуркаций Пригожина, возникновение упорядоченной структуры из беспорядка означает неожиданное и резкое отклонение поведения системы от соответствующей термодинамической ветви, скачкообразное изменение свойств, получившее название "бифуркация". Возникновение бифуркаций связано с флуктуациями – беспорядочным, чисто случайным явлением, которое проявляется в определенных условиях и вызвано специфическими молекулярными свойствами микроскопических составляющих, т.е. тем, что по определению не учитывается равновесной термодинамикой и линейной неравновесной термодинамикой. В равновесных системах флуктуации симметричны, обратимы, случайны и образуют сплошной фон. Их эволюция может быть ограниченной и кратковременной, а поэтому они, как правило, не влияют на свойства системы. Известным исключением является флуктуация плотности, определяющая броуновское движение коллоидной частицы и классическое релеевское рассеяние света гомогенной средой. Общий характер равновесных процессов, в которых отсутствуют бифуркации, не зависит от особенностей внутреннего строения и взаимодействий микроскопических частиц. Именно благодаря этому обстоятельству равновесная термодинамика обладает единым теоретическим базисом – универсальной теорией, не учитывающей внутренних свойств элементарных составляющих и, следовательно, справедливой для всех процессов такого рода, и поэтому может строиться как наука исключительно на аксиоматической основе.

Иная ситуация в неравновесных диссипативных системах. Хотя и здесь появление флуктуаций случайно, но не случайна их различная устойчивость, ведущая к избирательной стабилизации некоторых из флуктуаций и рождению детерминизма, а следовательно, и самого механизма структурной самоорганизации. Можно сказать, что образование диссипативных структур – это эволюция бифуркационных флуктуаций, обусловленная в начале процесса внутренним строением и согласованными взаимодействиями микроскопических частиц, а затем вполне определенной структурой со специфическими, также достаточно строго согласованными контактами

между последовательно усложняющимися ансамблями, которые выступают как подсистемы формирующейся макроскопической диссипативной системы.

Таким образом, отдельные виды флуктуаций, спонтанно выделяющиеся из сплошного спектра случайных отклонений и эволюционирующие при неравновесном процессе вдали от равновесия, предстают одновременно и как выразители индивидуальных свойств микроскопических частиц и их взаимодействий, и как накопители, усилители и интеграторы этих свойств и, тем самым, как преобразователи и трансформаторы их в качественно новые макроскопические свойства диссипативной структуры. Бифуркации порождают необратимые процессы, которые активизируют и организуют систему. При соблюдении соответствующих внешних условий содержание и последовательность реализации необратимых флуктуаций детерминированы и определяются исключительно индивидуальными свойствами микроскопических составляющих.

Неравновесная модель свертывания. Начнем обсуждение модели с определения минимального фазового и компонентного состава системы, обеспечивающей спонтанное протекание процесса в изолированных условиях. Не нарушая общности модели свертывания, во всяком случае, применительно к условиям *in vitro*, будем считать, что объектом рассмотрения является мономерный белок. Имеющиеся опытные данные о структурной самоорганизации белков позволяют представить укладку линейной аминокислотной последовательности в трехмерную структуру как внутримолекулярный процесс, который полностью определяется проявляющимися в соответствующих условиях свойствами единичной полипептидной цепи. Иными словами, свертывание не зависит от концентрации белка, и поэтому модель может включать лишь одну белковую молекулу. В систему должна входить также водная фаза. Для предварительного феноменологического описания процесса не требуется учет конкретных специфических свойств среды, обуславливающих реализацию заложенной в белковой цепи потенции к самоорганизации. Пока будем считать водное окружение гомогенным, обладающим необходимыми для сборки белка свойствами.

Таким образом, выбранная модельная система состоит из двух подсистем – единичной природной аминокислотной последовательности и водной среды. Является ли такая двухфазная система макроскопической в термодинамическом, статистическом смысле? Чтобы стать объектом равновесной термодинамики, все ее подсистемы должны представлять собой совокупность множеств несвязанных друг с другом частиц. Макроскопичность белковой подсистемы определяется большим числом образующих молекулу белка атомов (порядка 10^3 – 10^4) и значительным количеством конформационных степеней свободы (10^2 – 10^3), позволяющих полипептидной цепи в принципе принимать множество микроскопических состояний (10^n , где n – число аминокислотных остатков в цепи). Однако эта подсистема не может быть представлена совокупностью беспорядочно перемещающихся и не взаимодействующих друг с другом атомов. Напротив, все они эффективно связаны между собой посредством валентных и невалентных взаимодействий. Тот факт, что разные природные amino-

кислотные последовательности в одинаковых условиях свертываются существенно различным образом, неоспоримо доказывает, что совокупность невалентных взаимодействий влияет на траектории движения включенных в данную валентную схему атомных групп, делает движения атомов взаимозависимыми, не совсем хаотичными, что в конечном счете, как увидим, определит механизм структурной самоорганизации белка. На это же указывают данные противоположного характера, касающиеся синтетических полимеров, в том числе, полипептидов, и практически всех биологических макромолекул небелковой природы. В значительной мере лишенные специфических корреляций между звеньями полимерной цепи, они ни при каких условиях не образуют идентичных для всех молекул стабильных трехмерных структур, и в крайнем случае принимают конформационные состояния с участками линейной регулярности. Белковая макромолекула в водном окружении подвержена лишь одному виду истинно хаотического движения – броуновскому движению.

Что касается второй подсистемы – водного окружения, то она состоит из множества малых молекул, склонных, однако, в силу своей природы к образованию сильных водородных связей и электростатическим взаимодействиям. Ни одно свойство жидкой воды не может быть описано на основе предположения о полностью хаотичном движении отдельных молекул. Эксперименты, в частности инфракрасные спектры, вообще не обнаруживают в жидкой воде при комнатной температуре свободных молекул воды. Дж. Бернал еще в 1932 г. в рентгеноструктурном исследовании воды в ее жидкой фазе впервые наблюдал зародышевые формы кристаллов, а годом позже вместе с Р. Флаулером выдвинул гипотезу о существовании в воде трех типов структур, непрерывно переходящих друг в друга [44]. Тщательный статистический анализ данных о многих свойствах воды, предпринятый Г. Немети и Г. Шерагой в 1962 г., привел авторов к заключению о присутствии в воде при нормальных условиях значительных количеств ассоциатов с одной, двумя, тремя и четырьмя межмолекулярными водородными связями [45]. Специфика взаимодействия воды с природной аминокислотной последовательностью, обуславливающая возможность последней к структурированию, определяется не абсолютно независимым хаотическим, тепловым движением молекул воды, а движением сложной многофазно структурированной воды, а также сильным поверхностным натяжением (большой избыточной энергией поверхностного слоя) и высокой избирательностью взаимодействий воды в контактном слое с разными по своей природе атомными группами белка. Итак, выбранная модель белкового свертывания, включающая две тесно взаимодействующие между собой подсистемы, не может быть отнесена к классическим термодинамическим макроскопическим системам.

Далее, будем считать, что на протяжении всего процесса структурной самоорганизации белка наша система не обменивается с окружающим пространством ни энергией, ни веществом, т.е. принадлежит к замкнутому типу систем. Исходим из того, что в начальный момент белковая молекула находится в состоянии флуктуирующего клубка. Аттрактором спонтанно возникающего изотермо-изобарического процесса свертывания белковой цепи является равновесное состояние, в котором белок приобретает

высокоорганизованную, очень устойчивую трехмерную структуру. Процесс идет без нарушения второго начала термодинамики, т.е. протекает с повышением энтропии всей системы и заканчивается, когда она достигает максимума. Выше отмечалось, что обсуждаемая модельная система не может быть объектом рассмотрения классической равновесной термодинамики. Как можно представить процесс свертывания цепи с точки зрения нелинейной неравновесной термодинамики?

Энтропийный фактор. Процесс свертывания не нарушит второе начало термодинамики, если неизбежное при образовании высокоорганизованной структуры уменьшение энтропии белковой цепи будет компенсироваться одновременным увеличением энтропии водной фазы и уменьшением энтальпии системы. Реализация того и другого связана с эффектом так называемых гидрофобных взаимодействий, возникающих при контактах молекул воды с атомными группами неполярных органических молекул. Энтропийная природа этих взаимодействий была обоснована У. Козманом [46], который показал, что на каждую неполярную алифатическую боковую цепь, покидающую водное окружение, энтропия возрастает на ~30 ккал/моль·град, а свободная энергия понижается на 5–10 ккал/моль. У большинства белков число остатков, склонных к гидрофобным взаимодействиям, превышает 50% всего аминокислотного состава. Поэтому энтропийный эффект, ведущий к экранизации гидрофобных атомных групп от молекул воды, играет существенную ориентационную роль в свертывании белковой цепи. Об этом, в частности, свидетельствует сильное денатурирующее действие, оказываемое на структуру белка слабо полярными органическими растворителями, мочевиной, производными гуанидина и другими соединениями.

Результатом гидрофобных взаимодействий является диспропорционирование энтропии, т.е. увеличение порядка у одной подсистемы за счет его уменьшения у другой. При этом, однако, не возникают какие-то новые по своей природе дополнительные силы и, следовательно, выражение "гидрофобные силы", строго говоря, лишено физического смысла. Рассматриваемые взаимодействия обусловлены водным окружением аминокислотной последовательности и специфической структурой воды. Следствием гидрофобного эффекта является образование энергетически наиболее предпочтительных внутримолекулярных и внешних контактов между родственными по своей природе атомными группами. Эффективность контактов количественно оценивается с помощью известных потенциальных функций ван-дер-ваальсовых, электростатических и торсионных взаимодействий и водородных связей.

Знание направленности изменений энтропии и энтальпии при структурировании белковой цепи и понимание физического смысла причин этих изменений, безусловно, необходимы, но недостаточны для трактовки важнейших особенностей процесса структурной самоорганизации белка. Изменения параметров ΔS и ΔH , являющихся функциями состояния системы, в принципе ничего не могут сказать о конкретном механизме перехода флуктуирующего клубка в детерминированную трехмерную структуру, его обратимости и необратимости, побудительных мотивах и кинетике. При использовании функции состояния путь, проходимый белковой цепью

между его началом и концом, так и остается *terra incognita*. Выяснение механизма неравновесного процесса, каким является сборка белка, требует установления корреляций между свойствами макроскопической системы (в данном случае трехмерной структурой молекулы) и ее микроскопических составляющих (конформационными возможностями аминокислотных остатков). Связь, которую нужно раскрыть, проявляется в необратимых флуктуациях – источнике спонтанного возникновения порядка из хаоса.

Необратимые флуктуации и механизм самоорганизации белка. Предполагают, что в начальный период все флуктуации – периодические вращения атомных групп вокруг ординарных связей – являются беспорядочными и несинхронизированными друг с другом. В равновесных системах все флуктуации обратимы и согласно основной теории вероятности (так называемого закона больших чисел) составляют пренебрежимо малые поправки к средним значениям. За редким исключением (например, рассеяние света гомогенной средой и броуновское движение, вызываемые обратимыми флуктуациями плотности) они не коррелируют со свойствами системы и не оказывают влияние на ее переход в равновесное состояние. В неравновесных системах среди множества обратимых, неустойчивых флуктуаций возникают необратимые флуктуации, оказывающие радикальное воздействие на эволюцию системы. Они не остаются малыми поправками к средним значениям, а существенно меняют сами эти значения, стирая различие между случайным отклонением и макроскопическим проявлением системы. При свертывании белка подавляющее большинство флуктуаций также обратимо и неустойчиво. Но некоторые из них приводят к сближению определенных аминокислотных остатков, и тогда те могут эффективно взаимодействовать между собой. По своим последствиям образующиеся контакты между валентно-несвязанными атомами могут быть подразделены на близко-, средне- и дальнедействующие. Флуктуации, приводящие к образованию первого вида, изменяют взаимное расположение атомных групп в пределах одного аминокислотного остатка; второго вида – расположение остатка относительно соседних в последовательности; третьего – относительно удаленных по цепи остатков. В зависимости от конформационного состояния белковой цепи по ходу ее сборки одни и те же флуктуации могут быть как обратимыми, так и необратимыми. Последними, т.е. бифуркационными, флуктуации становятся только в том случае, если каждая из них возникает в строго определенном месте последовательности бифуркаций между флуктуирующим клубком и трехмерной структурой. Обратимые флуктуации бесследно исчезают, а необратимые, стабилизированные специфическими невалентными взаимодействиями остатков, остаются в виде гигантских "застывших флуктуаций".

Бифуркационные флуктуации, как правило, представляют собой более или менее сложные комбинации случайных отклонений отдельных атомных групп, целых остатков или фрагментов, которые возникают почти одновременно. Очевидно, такие наборы конформационных отклонений будут стабильными, если все входящие в них элементарные флуктуации окажутся согласованными между собой, т.е. будут отвечать таким взаим-

ным ориентациям остатков, которые являются наиболее предпочтительными по энергии и внутри- и межостаточных взаимодействий валентно-несвязанных атомов. Иными словами, каждая из бифуркаций должна соответствовать выгодному по энергии взаимному расположению атомных групп в пределах одного аминокислотного остатка, а определенное сочетание образующих данную бифуркацию элементарных случайных отклонений приводит к дополнительным стабилизирующим взаимодействиям более удаленных атомных групп, принадлежащих соседним по цепи или пространственно сближенным остаткам.

Что нужно, чтобы такое событие, несмотря на случайность и беспорядочность всех флуктуаций, непременно произошло бы? Необходимо, чтобы единственно возможный при самопроизвольном характере процесса беспорядочно-поисковый механизм сборки белка осуществлялся быстро и безошибочно, т.е. приводил одинаковые аминокислотные последовательности к идентичным пространственным структурам за время, затрачиваемое при биосинтезе белка.

Для рассматриваемой модели это условие на первый взгляд выглядит нереальным, так как число возможных комбинаций случайных и беспорядочных конформационных флуктуаций белковой цепи невероятно велико, и появление среди них бифуркационных флуктуаций как будто бы ничтожно мало. Перебор всех микроскопических состояний даже у самых низкомолекулярных белков занял бы не менее 10^{30} лет. Противоречие между характером описываемого процесса и наблюдаемой продолжительностью свертывания снимается, если предположить, что актуальные на первом этапе сборки белка бифуркационные флуктуации возникают независимо и одновременно на разных участках полипептидной цепи. Иными словами, начало пространственного структурирования белка представляется рядом параллельно идущих процессов формообразования как бы не связанных друг с другом олигопептидных фрагментов молекулы. Чтобы это действительно могло происходить при вполне определенном сочетании необратимых флуктуаций, следует допустить возможность образования конформационно достаточно жестких структур только за счет взаимодействий остатков в пределах сравнительно коротких участков белковой цепи. При количестве возможных сочетаний низкоэнергетических флуктуаций порядка 10^n (n – число аминокислотных остатков) и продолжительности одной флуктуации $\sim 10^{-14}$ с время вероятного появления локальной структуры при беспорядочно-поисковом механизме ориентировочно равно 10^{n-14} с. Следовательно, для фрагмента белковой цепи, например с $n = 12$, время сборки составит всего 10^{-2} с. Чтобы процессы структурирования разных участков аминокислотной последовательности могли идти параллельно и независимо друг от друга, требуется также предположить чередование в белковой цепи конформационно жестких и лабильных фрагментов.

Неизбежность появления особых необратимых флуктуаций, вызывающих зарождение порядка из хаоса – уникальное свойство белковых молекул, обусловленное их химическим строением. Гетерогенность природной аминокислотной последовательности порождает термодинамическую неоднородность флуктуаций, дифференцируя их на обратимые и

необратимые. Это ведет к возникновению специфической конформационной гетерогенности – альтернированию вдоль цепи конформационно жестких и лабильных участков, которое в конечном счете обеспечивает свертывание белковой молекулы, делает процесс быстрым и безошибочным.

При неминуемом появлении в статистическом клубке устойчивых необратимых флуктуаций одни участки примут стабильные формы, а другие, промежуточные, останутся подвижными, хотя и их конформационная свобода за счет межостаточных взаимодействий значительно ограничится. Переход клубка в первое промежуточное состояние – результат действия бифуркаций на локальных участках. Их образование – поворотный момент, который определяет направленность процесса сборки и характер его дальнейшего развития. Впоследствии, также за счет случайно возникших флуктуаций, в специфические взаимодействия вовлекаются удаленные по цепи аминокислотные остатки из разных участков, и белок переходит во второе промежуточное состояние. Структурирование, вызванное новым набором согласованных необратимых флуктуаций, осуществляется за счет сближенности комплементарных и избирательно взаимодействующих конформационно жестких и лабильных фрагментов. Последние при этом обретают определенную форму. Появление в течение разумно короткого времени на завершающем этапе сборки необратимых флуктуаций на значительно больших, но уже частично структурированных участках также неизбежно. Увеличение количества взаимодействующих между собой остатков сопровождается уменьшением конформационных степеней свободы. Так что и здесь возможно выявление за короткое время необратимых флуктуаций при беспорядочно-поисковом механизме.

Итак, благодаря избирательности бифуркационных флуктуаций и их строгой согласованности структурная самоорганизация белковой молекулы приобретает детерминистические черты (случайность порождает необходимость). Из конформационно жестких и взаимодействующих с ними лабильных фрагментов возникают нуклеации, которые через ряд чисто случайных, но тем не менее неизбежных и строго последовательных событий входят в домены или в нативную трехмерную структуру белка. Весь процесс самосборки пространственной структуры не требует времени больше, чем затрачивается на рибосомный синтез белковой цепи. Уникальность бифуркаций, порядок их возникновения и устойчивый конструктивный характер обусловлены конкретной, отобранной в ходе эволюции аминокислотной последовательностью. В то же время рассматриваемая модель свертывания не исключает образование "неправильных" промежуточных состояний, содержащих структурные элементы, отсутствующие в конечной конформации. Более того, поскольку в основу модели положен беспорядочно-поисковый механизм, осуществляющий сборку белка методом "проб и ошибок", то возникновение непродуктивных состояний белковой цепи становится неизбежным. Однако они нестабильны, так как продуктивные состояния, появляющиеся в результате бифуркационных флуктуаций, всегда более предпочтительны по энергии. К обсуждению этого вопроса вернемся в главе 17 при количественном описании механизма ренатурации панкреатического трипсинового ингибитора.

Описанная модель структурной самоорганизации белка непосредственно отвечает ренатурационному процессу, протекающему в условиях *in vitro*, когда исходное конформационное состояние молекулы максимально неупорядоченно. Сборка белка в процессе биосинтеза и при содействии шаперонов протекает в принципе по тому же беспорядочно-поисковому механизму и поэтому не требует разработки специальных моделей. Возможность свертывания аминокислотной последовательности до окончания синтеза и отхода от рибосомы в первом случае, и взаимодействие флуктуирующей цепи со специфическими белками во втором ограничивают конформационную свободу неструктурированного белка. В результате уменьшается количество обратимых, непродуктивных флуктуаций, увеличивается вероятность появления бифуркаций и, следовательно, сокращается время сборки. Иными словами, запрещая целый ряд обратимых флуктуаций, шапероны сближают друг с другом бифуркационные точки и тем самым делают процесс самоорганизации нативной конформации белка более эффективным.

На первый взгляд может показаться, что рассмотренный механизм структурирования белковой цепи принципиально не отличается от кристаллизации низкомолекулярных соединений и образования у некоторых синтетических полимеров линейных регулярных форм. Это, однако, не так, хотя в обоих случаях процессы осуществляются посредством случайных флуктуаций и взаимодействий валентно-несвязанных атомов. Существенное различие состоит в том, что кристаллизацию малых молекул в насыщенном растворе и формирование ближнего порядка (одномерного кристалла) у искусственного полимера можно представить равновесными процессами, т.е. путем обратимых флуктуаций и непрерывных последовательностей равновесных состояний. Сборку же белковой цепи в трехмерную структуру нельзя даже мысленно провести только через равновесные положения системы и без привлечения бифуркационных флуктуаций. Механизм пространственной самоорганизации белка имеет статистико-детерминистическую природу и поэтому является принципиально неравновесным. Его реализация невозможна без необратимых флуктуаций, а его описание – без установления связи между свойствами макроскопической системы и внутренним строением ее микроскопических составляющих. С позиции равновесной термодинамики подобные явления просто не могут существовать.

В настоящее время известно много нелинейных неравновесных процессов в неорганическом мире, протекающих в физических и химических открытых системах с фазовым диспропорционированием энтропии. Некоторые из них обсуждены в главе 15 предшествующего тома [2. Раздел 15.3] и во введении настоящей книги. Поэтому саму по себе истинную неравновесность процесса самосборки белка нельзя еще считать бесспорным отличительным признаком живой материи. Однако во всех известных нелинейных неравновесных процессах, кроме структурной самоорганизации белка, поддержание возникшего из хаоса порядка в стационарном режиме оказывается возможным только при постоянном потреблении энергии извне и увеличении энтропии окружающей среды. Ячейки Бенара будут сохраняться лишь при подогреве, лазер испускать когерентное

излучение при накачке и т.д. У белков повышение энтропии водного окружения происходит только в период их структурной самоорганизации с выделением тепла, а не поглощением, как в других случаях возникновения порядка из хаоса. Созданная структура белково-водного комплекса отвечает не стационарному, а равновесному состоянию, не нуждающемуся в постоянной негэнтропийной и энергетической инъекции из окружающего белок раствора.

2.2. ФИЗИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКА

Рассмотренная в разделе 2.1 феноменологическая бифуркационная теория свертывания белковой цепи – лишь пролегомены, самый первый шаг к созданию физической теории структурной организации белка и количественного расчетного метода. Неравновесная термодинамическая модель теории сформулирована в такой общей форме, которая еще не допускает прямой экспериментальной проверки. Значение предложенной теории состоит в том, что она, во-первых, дает принципиальную трактовку всем важнейшим особенностям структурной самоорганизации белка: беспорядочно-поисковому механизму сборки аминокислотной последовательности, высокой скорости и безошибочности процесса образования трехмерной структуры и, во-вторых, указывает, как показано ниже, направление дальнейшего поиска и раскрывает его содержание. В частности, принципиальное значение имеет то обстоятельство, что бифуркационная теория впервые позволила представить процесс свертывания белка, не требующий при беспорядочно-поисковом механизме сборки рассмотрения всех мыслимых конформационных состояний белковой цепи. Однако сама по себе термодинамическая теория статистико-детерминистического явления не может привести к такому уровню понимания процесса свертывания белковой цепи, который необходим для количественной оценки всех логических связей между аминокислотной последовательностью, трехмерной структурой и окружающей средой, а следовательно, и для апробации лежащих в основе теории принципов. Задача может считаться решенной только после создания физической конформационной теории и расчетного метода, предсказывающих по известному расположению аминокислот в белковой цепи координаты всех атомов в нативной трехмерной структуре и количественно описывающих механизм сборки последней. Лишь при достижении цели, поставленной именно таким образом, физическая теория структурной организации белка сможет стать основой для решения следующих фундаментальных задач, связанных уже с установлением зависимости между строением и функцией. В этом разделе рассмотрены основные положения предложенной автором структурной теории белка [38–42].

Эволюционно отобранные полимерные аминокислотные последовательности, как отмечалось, наделены исключительной, только им присущей, способностью принимать в водной среде при определенных внешних условиях достаточно строго детерминированные трехмерные структуры.

Уникальные для каждой последовательности, они обладают специфическими динамическими конформационными свойствами, необходимыми для осуществления соответствующих функций. В этом отношении белки принципиально отличаются от синтетических полимеров, в том числе родственных по химическому типу гомополипептидов и гетерополипептидов со случайным порядком аминокислот в цепи. В растворе они существуют в виде множества близких по энергии и непрерывно флуктуирующих конформационных состояний, а в твердом виде представляют собой аморфную смесь разных пространственных форм, среди которых могут быть и одномерные регулярные формы. Поэтому здесь не возникает самой проблемы поиска геометрии и конформационных возможностей молекулярных трехмерных структур.

Пространственное строение и другие свойства синтетических полимеров в растворе отвечают состоянию статистического клубка и описываются усредненными параметрами. Молекулярная поворотнo-изомерная теория синтетических полимеров, являющаяся составной частью статистической физики, была разработана в 1950-е годы М.В. Волькенштейном [47] и позднее развита Т.М. Бирштейном и О.Б. Птицыным [48] и П. Флори [49]. Основы теории фазовых переходов полимеров были заложены в 1968 г. И.М. Лифшицем [50]. Хотя белки являются полимерами и их пространственное строение также определяется поворотной изомерией, тем не менее механизм структурной организации и особенности нативных конформаций белковых молекул не могут быть рассмотрены в рамках отмеченных теорий, базирующихся на равновесной термодинамике и конфигурационной статистике полимерных цепей.

Рассматриваемая здесь задача является качественно иной, имеющей смысл только для избранных, главным образом, природных аминокислотных последовательностей. Поэтому ее решение может быть выполнено лишь на основе самостоятельной теории, учитывающей выработанную эволюцией конформационную специфику белков, а именно статистико-детерминистический механизм структурной самоорганизации и детерминистическую (в отношении как статических, так и динамических свойств) природу нативных конформаций белковых молекул. Стремление описать сборку белка с чисто статистических позиций, не учитывающих гетерогенности цепи и взаимообусловленности поведения макроскопической системы от внутреннего строения микроскопических составляющих, объясняется иллюзорным представлением о том, что в этом случае можно идти по уже проторенному для синтетических полимеров пути и тем самым избежать разработки несравненно более сложного статистико-детерминистического подхода. Однако традиционный поиск решения не отвечает самой сущности рассматриваемого явления, и, следовательно, все попытки дать чисто статистическую трактовку структурной самоорганизации белка следует признать, как отмечалось, обреченными на неудачу (см. разд. 1.3).

Основные положения физической теории. Ни одному из известных опытных фактов не противоречит сформулированное Р. Ламри и Г. Эйрингом в 1954 г. положение о том, что нативная конформация белковой молекулы отвечает термодинамически равновесному состоянию [51]. Это состояние обладает минимальной свободной энергией Гиббса, т.е. является

ся глобальным, не зависящим от предыстории. Оно определяется при соответствующих внешних условиях только составом и порядком расположения аминокислот в полипептидной цепи. Положение Ламри и Эйринга согласуется с бифуркационной теорией свертывания белковой цепи, более того, является неизбежным следствием данной теории. Поэтому включим его в физическую конформационную теорию белка в качестве ее первого основного принципа, внося одно уточнение, имеющее важное методологическое значение. Поскольку процесс структурной самоорганизации белка сопровождается диспропорционированием энтропии (уменьшением энтропии у свертывающейся аминокислотной последовательности и увеличением у окружающей водной среды), для соблюдения второго начала термодинамики высокоупорядоченная трехмерная структура должна быть, согласно изотермо-изобарическому потенциалу Гиббса, самой предпочтительной не только по свободной энергии, но и по энтальпии и, тем более, по внутренней конформационной энергии – потенциальной энергии взаимодействий валентно-несвязанных атомов белковой молекулы. Таким образом, предполагается, что нативная конформация белка в физиологических условиях является глобальной в отношении внутренней энергии.

Имеющиеся экспериментальные данные свидетельствуют о том, что трехмерные структуры белков характеризуются плотнейшей упаковкой атомов. Коэффициенты упаковки белковых молекул в нативном состоянии имеют значения от 68 до 82%. Для сравнения напомним, что у правильных сферических тел этот коэффициент равен 74%, а у молекул воды и циклогексана – 58 и 44% соответственно. По плотности упаковки атомов белковые молекулы близки кристаллам малых органических молекул (70–78%). Нативные структуры белков имеют также незначительные коэффициенты сжимаемости, близкие, например, коэффициентам сжимаемости олова и каменной соли. Высокая компактность глобулярных белков подтверждается большой плотностью, малой вязкостью и малыми молекулярными объемами нативных белков в растворе. Так, наблюдаемые у них величины плотности ($1,3\text{--}1,5\text{ г/см}^3$) выше, чем у сухих белков и близки величинам плотности кристаллов низкомолекулярных органических соединений. Это свойство пространственных структур белковых молекул безупречно с физической точки зрения и очень образно передает определение их как "аперриодические кристаллы" – термин, использованный Э. Шредингером для характеристики состояния хромосом [52]. Таким образом, есть все основания заключить, что нативная конформация белка представляет собой плотно упакованную структуру с максимальным числом внутримолекулярных контактов между валентно-несвязанными атомами.

Этот тезис, как и положение о том, что трехмерная белковая структура обладает минимальной внутренней энергией, не является, однако, достаточной основой для разработки расчетного метода физической теории, позволяющего по известной аминокислотной последовательности однозначно идентифицировать среди множества возможных конформационных вариантов единственную физиологически активную конформацию белка. Кроме того, нереально определение геометрических параметров этой конформации путем минимизации энергии всех внутримолекулярных невалентных взаимодействий по всем степеням свободы. Дости-

жение цели мыслимо лишь при разделении конформационной проблемы белка на ряд связанных между собой менее громоздких проблем и их последовательного рассмотрения. Создание конформационной теории требует разработки поэтапного механизма структурной самоорганизации белка, раскрытия его физической сущности и на такой основе теоретического моделирования процесса сборки. Это главный, ключевой вопрос всей проблемы.

Перебор всех возможных состояний полимерной белковой цепи и нахождение среди них глобальной конформации, вообще говоря, невозможны не только для человека с его вычислительной техникой сегодняшнего дня и сколь угодно отдаленного будущего, но и для самой природы. Во всяком случае, природа избрала для этого совершенно иной механизм сборки белка, которому, возможно, отвечает бифуркационный процесс, постулируемый термодинамической теорией, рассмотренной в предыдущем разделе. Согласно теории свертывание белковой аминокислотной последовательности обладает двойственным характером. С одной стороны, весь процесс, начиная с состояния флуктуирующего статистического клубка и до конечной трехмерной структуры, осуществляется исключительно по беспорядочно-поисковому механизму. Иначе он не мог бы быть самопроизвольным. С другой стороны, структурная организация белка является детерминированным процессом, протекающим по определенному пути со строго последовательным рядом стадий. В противном случае сборка белковой цепи не совершалась бы столь быстро и безошибочно.

Совместить диаметрально противоположные статистические и детерминистические особенности процесса, выявить их взаимообусловленность и показать неизбежность спонтанного возникновения высокоупорядоченной структуры из флуктуирующего клубка оказалось возможным лишь с помощью нелинейной неравновесной термодинамики. В предложенной на этой основе теории сборки белка постулируется динамическая гетерогенность белковой цепи, которая заключается в альтернировании вдоль развернутой аминокислотной последовательности потенциально конформационно жестких и лабильных участков. Первые могут образовывать относительно стабильные пространственные формы за счет невалентных взаимодействий входящих в них остатков, а вторые – представительные наборы близких по энергии и, следовательно, равновероятных форм. При такой конформационной дифференциации белковой цепи начальный этап ее структурирования предстает в виде возникающих одновременно и идущих параллельно и практически независимо друг от друга процессов свертывания локальных участков. Если протяженность чередующихся конформационно жестких и лабильных фрагментов сравнительно невелика, то при чисто случайно-поисковом механизме становится гарантированным появление в течение короткого времени необратимых бифуркационных флуктуаций, являющихся причиной реализации потенции определенных участков белковой цепи к автономному структурированию.

Первые бифуркационные флуктуации, необратимо стабилизирующие пространственные формы некоторых участков белковой цепи, – это определяемые аминокислотной последовательностью сочетания конформа-

ционных состояний входящих в такие участки остатков. Они возникают спонтанно как неизбежный результат случайного и беспорядочного перебора всех возможных конформационных изменений. Можно полагать, что необратимость бифуркационных флуктуаций обусловлена согласованностью невалентных внутриостаточных и межостаточных взаимодействий атомов в пределах каждого жесткого фрагмента. Промежуточные, конформационно более лабильные участки белковой цепи также претерпевают в этот период сборки серьезные изменения. Из огромного массива состояний ($>10^n$, n — число остатков в фрагменте) путем все того же беспорядочно-поискового механизма за время $t \sim 10^{n-14}$ с создается несравненно более ограниченный набор флуктуирующих форм. Таким образом, начальный этап структурной организации полностью денатурированного белка фактически представляется независимым свертыванием отдельных олигопептидных молекул. В результате одни участки белковой цепи за счет согласованных невалентных взаимодействий составляющих их остатков обретают устойчивые пространственные структуры; другие же, промежуточные участки цепи, конформационные возможности которых не в полной мере ограничиваются взаимодействиями близко расположенных в цепи остатков, приобретают состояния, отвечающие совокупностям изоэнергетических структур.

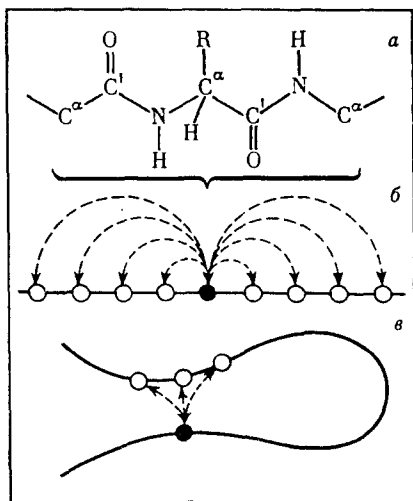
На следующем этапе сборки проявляется взаимообусловленность конформационных состояний двух или большего числа жестких фрагментов и разделяющих их лабильных участков цепи. Рост длины цепи взаимодействующих остатков, однако, не сказывается существенным образом на продолжительности случайного поиска бифуркационных флуктуаций. Одновременно с увеличением размера автономно свертывающегося пептидного участка, включающего жесткие и лабильные фрагменты, резко сокращается число конформационных степеней свободы за счет их фиксации у первых и уменьшения конформационных возможностей вторых. Новая необратимая флуктуация возникает здесь на фоне более суженного базиса беспорядочных тепловых движений. Момент появления такой флуктуации случаен, но не случаен как сам факт ее появления, так и соответствующее ей стабильное конформационное состояние, определяемое лишь аминокислотной последовательностью данного участка белковой цепи. Энергетическая предпочтительность образовавшейся пространственной структуры обусловлена согласованностью невалентных взаимодействий не только между соседними остатками, что определило возникновение первой бифуркации, но и между далеко расположенными в цепи остатками.

Согласно бифуркационной теории механизмы свертывания белковой цепи в процессе ренатурации и по ходу рибосомного синтеза не должны иметь принципиальных отличий. Главное, что в обоих случаях структурная самоорганизация проходит через одну и ту же последовательность бифуркационных флуктуаций, ведущих к идентичным нативным конформациям. Различия, безусловно, есть, но они несущественны, поскольку не ставят под сомнение утверждение, что аминокислотная последовательность однозначно определяет трехмерную структуру белковой молекулы. Механизмы сборки в обоих случаях едины по своей природе и случайно-

Р и с. 1.1. Ближние (а), средние (б) и дальние (в) взаимодействия валентно-несвязанных атомов аминокислотных остатков, определяющих пространственную структуру белка

поисковому характеру. Одно из принципиальных различий касается обратимых, неустойчивых флуктуаций, т.е. событий, происходящих между бифуркациями. Второе различие обусловлено кинетикой процесса. При ренатурации свертывание происходит одновременно на всех участках белковой цепи, а при биосинтезе сборка начинается с N-конца и продолжается одновременно с ростом аминокислотной последовательности.

Предположение о согласованности в нативной конформации белка всех внутримолекулярных взаимодействий открывает принципиальную возможность для поэтапного, фрагментарного подхода к решению проблемы структурной организации белковой макромолекулы. Это можно осуществить путем последовательного анализа трех видов взаимодействий, определяющих конформационное состояние каждого аминокислотного остатка в трехмерной структуре. К ним следует отнести, во-первых, взаимодействия атомов одного остатка между собой и с атомами двух смежных пептидных групп (ближние взаимодействия), во-вторых, взаимодействия остатка с соседними в последовательности остатками (средние взаимодействия) и, в-третьих, взаимодействия остатка с удаленными по цепи остатками (дальние взаимодействия) (рис. 1.1). Предложенное разделение взаимодействий до некоторой степени условно. Однако среди возможных других оно представляется наиболее естественным и, как можно будет убедиться впоследствии, удобным с методологической точки зрения. Выделение трех видов невалентных взаимодействий (а не двух или четырех) не является полностью формальным, так как они довольно четко различаются по своим функциям в организации пространственной структуры молекулы белка. Но главное все же состоит не в способе разделения взаимодействий. Последовательное рассмотрение ближних, средних и дальних взаимодействий, как и взаимодействий, разделенных иным способом, может иметь смысл и привести к предсказанию нативной конформации белка только в том случае, если отобранные на предшествующих этапах наборы конформационных состояний аминокислотных остатков будут непременно включать состояния, удовлетворяющие условиям последующих этапов. Гарантом здесь является постулированное в теории положение о согласованности всех видов взаимодействий валентно-несвязанных атомов в нативной конформации белка.



Итак, в основу физической теории положены следующие принципы структурной организации белка: 1) нативная трехмерная структура и кон-

формационные динамические свойства белковой молекулы в физиологических условиях полностью определяются аминокислотной последовательностью; 2) нативная конформация белка отвечает глобальному минимуму внутренней энергии; 3) нативная конформация белка является наиболее плотно упакованной структурой; следовательно, на всех стадиях самопроизвольного свертывания белковой цепи внутримолекулярные взаимодействия валентно-несвязанных атомов превалируют над межмолекулярными взаимодействиями; 4) в нативной конформации белка имеет место согласованность между всеми внутримолекулярными взаимодействиями валентно-несвязанных атомов (ближними, средними и дальними).

Физическая теория пространственной организации белка, определяемая сформулированными выше принципами, является дальнейшим развитием рассмотренной ранее термодинамической теории. В нее привнесены отсутствующие у последней конкретные, детерминистические признаки структуры белка, связывающие конформационное поведение макроскопической системы со свойствами ее микроскопических составляющих. Термодинамическая теория является феноменологической. Она была призвана установить природу самоорганизации белка (и, действительно, установила, что сборка полипептидной цепи представляет собой статистико-детерминистический процесс), отнести рассматриваемое явление к адекватной его природе области естественнонаучных знаний (нелинейной неравновесной термодинамике) и дать качественно непротиворечивую трактовку всем важнейшим особенностям этого явления (спонтанному характеру, беспорядочно-поисковому механизму, высокой скорости и безошибочности). Физическая теория, в отличие от термодинамической, является не качественной, а количественной теорией, и должна послужить основой метода численного решения конформационной проблемы белка. Метод, опираясь на физическую модель, строится на поэтапном подходе и анализе конкретной белковой молекулы, нативная конформация которой предполагается самой предпочтительной по энергии, наиболее компактной и согласованной в отношении всех внутри- и межостаточных взаимодействий структурой.

В рассмотренной конформационной теории белка не постулируется образование в процессе структурной самоорганизации вторичных, регулярных структур. α -Спираль и β -складчатые листы должны автоматически появляться по ходу расчета на тех участках последовательности, где они оказываются самыми предпочтительными по энергии. Не привлекаются также данные рентгеноструктурного анализа белков и результаты их статистической обработки. Физическая теория и соответствующий расчетный метод исходят только из отмеченных выше четырех принципов, знания аминокислотной последовательности и валентной схемы белковой молекулы. Таким образом, в отношении пространственного строения белка теория является априорной. Предсказание трехмерной структуры строится на количественной оценке взаимодействий между всеми валентно-несвязанными атомами. При этом, однако, не требуется делать специальных предположений о роли в пространственной организации белковой молекулы водородных связей, ионных пар, дисульфидных мостиков и других видов взаимодействий. Так называемые гидрофобные

взаимодействия вообще не принимаются во внимание, поскольку никаких особых, "гидрофобных" сил не существует, а особенности структуры белка, продиктованные его взаимодействиями с водным окружением, учтены в постулированной физической модели (принцип 3). Окажется ли всего этого достаточно и будут ли вообще предложенные термодинамическая и физическая теории соответствовать реальной ситуации, можно будет судить лишь на завершающей стадии решения задачи структурной организации белка при сопоставлении результатов априорных расчетов с данными эксперимента. Ближайшая же цель состоит в разработке на основе изложенных теорий количественного метода конформационного анализа пептидов и белков.

Рассмотренные в этой главе методологические вопросы теоретического конформационного анализа были разработаны для исследования пространственного строения низкомолекулярных органических соединений. Что же касается нашей темы — структурной организации белков, то задача такого масштаба перед расчетным методом не ставилась, и поэтому многие важнейшие вопросы, вставшие на пути к априорному расчету нативных конформаций белковых макромолекул, остались незатронутыми. Так, даже в принципе не была обсуждена сама возможность использования классического подхода, предполагающего независимость электронного и конформационного состояний молекулы. Если считать справедливыми изложенные в этой главе бифуркационную и физическую теории структурной организации белка, то доказательство применимости механической модели к данному объекту является самой главной и прежде всего требующей ответа задачей. Однако принципиальная возможность использования полуэмпирического конформационного анализа в исследовании белков также еще не предопределяет положительного решения других вопросов. Необходима методология, специально разработанная для расчета пространственного строения белковых молекул. Верхним пределом применимости изложенного метода конформационного анализа, как показано ниже, являются лишь три- и в простейших случаях тетра- и пентапептиды. Таким образом, второй важнейший вопрос на пути к решению проблемы структурной организации белка заключается в создании специфического методологического подхода, в который существующий метод конформационного анализа вошел бы как составная часть.

Разработка правильной теории, доказательство применимости механической модели к природным макромолекулам и создание соответствующего метода исследования все еще не гарантируют решения структурной проблемы белков. Расчет пространственного строения беспрецедентных по своей сложности белковых молекул, исходя только из знания их химического строения, может оказаться несостоятельным по чисто физическим и математическим причинам. Воздвигаемое здание может рухнуть из-за несовершенства потенциальных функций и параметризации методов минимизации энергии многоатомных систем по многим переменным, алгоритмов и программ счета на ЭВМ, накопления ошибок и многих других вопросов, не предполагаемых в начале поиска решения, а возникающих, как правило, неожиданно. Особенность рассматриваемой проблемы структурной организации белка заключается еще и в том, что все

отмеченные трудности ее решения не могут быть преодолены по отдельности. Об удовлетворительном решении всех составных элементов проблемы можно будет судить лишь в самом конце завершающей стадии априорного расчета трехмерной структуры белка по совпадению независимых теоретических результатов с опытными данными. Отмеченные трудности в разработке теории структурной самоорганизации белковых молекул и метода расчета их нативных конформаций стали ясны уже после получения принципиальных результатов. В самом начале исследования, в конце 1960-х годов, автор в значительной мере пребывал в счастливом неведении; во всяком случае, трудности не представлялись ему непреодолимыми апориями. Это было время, когда от только что родившейся молекулярной биологии ждали любых открытий. Очень часто ожидания оказывались не напрасными, и многие явления живой природы, остававшиеся совершенно непонятными и даже таинственными, вдруг неожиданно оказывались до очевидности простыми истинами.

При поиске решения структурной проблемы белка особенно вдохновляющими примерами явились результаты теоретических исследований Л. Полинга и Р. Кори регулярных структур полипептидов [53] и Дж. Уотсона и Ф. Крика двойной спирали ДНК [54]. В этих работах с помощью простейшего варианта конформационного анализа – проволочных моделей, получивших позднее название моделей Кендрию–Уотсона, а также ряда экспериментальных данных, прежде всего результатов рентгеноструктурного анализа волокон (в случае ДНК еще и специфических соотношений оснований Э. Чаргаффа), удалось предсказать наиболее выгодные пространственные структуры полимеров. Собственно, предсказана была как в случае пептидов, так и нуклеиновых кислот, геометрия лишь одного звена, которое в силу регулярности обоих полимеров явилось трансляционным элементом. Белок же – гетерогенная аминокислотная последовательность, и поэтому таким путем предсказать его трехмерную структуру нельзя. Но то обстоятельство, что простейший, почти качественный, конформационный анализ привел к количественно правильным геометрическим параметрам низкоэнергетических форм звеньев, повторяющихся в гомополипептидах и ДНК, указывало на большие потенциальные возможности классического подхода и его механической модели в описании пространственного строения молекул.

В анализе белков, однако, требовалось рассмотрение не единичных структурных вариантов элементарных звеньев (пусть и правильно предсказанных) гомополипептидов, а множества, причем не независимо, а в сочетании друг с другом. Здесь важно было не упростить расчетную модель, не выхолостить физический смысл и не свести ее к представлению о пространственной структуре белка как ансамбле регулярных канонических форм: α -спиралей и β -складчатых листов. От этого ложного шага автора предостерегли результаты исследования Д. Филлипса трехмерной структуры лизоцима [55]. После миоглобина и гемоглобина он был третьим белком, у которого было расшифровано с помощью рентгеноструктурного анализа молекулярное пространственное строение. И если трехмерные структуры первых двух белков содержали не менее 75% α -спиральных остатков, то структура лизоцима оказалась существенно

иррегулярной. α -Спираль вообще не обнаруживались, а содержание β -складчатых листов не превышало 20%. Таким образом, кристаллографические данные о миоглобине, гемоглобине и лизоциме, ставшие известными к моменту начала работы, убедили в том, что в основу теории структурной организации белков не может быть положена концепция вторичных структур Полинга и Кори.

Основные положения предложенной мною конформационной теории белков были сформулированы в общем виде и имели вначале чисто эвристический характер [40, 41]. Создание расчетного метода требовало их детализации и тщательной проверки. Достоинство теории даже в ее первоначальной, быть может, несовершенной форме заключалось в том, что она позволяла всю необходимую работу с первой и до завершающей стадии заранее представить в виде строго последовательного ряда логически связанных между собой шагов, где каждое продвижение вперед опиралось на результаты предшествующих исследований и предвляло последующее. Иными словами, теория, отражавшая вначале чисто субъективное представление автора о структурной организации белка, в то же время представляла собой достаточно четко ориентированную рабочую программу исследования. Одно из положений теории, а именно предположение о согласованности в белковой глобуле всех внутри- и межостаточных взаимодействий, давало возможность разделить задачу на три большие взаимосвязанные части. Цель первой заключалась в конформационном анализе свободных остатков стандартных аминокислот, т.е. в оценке ближних взаимодействий валентно-несвязанных атомов. Идеальными моделями для изучения ближних взаимодействий явились молекулы метиламидов N-ацетил- α -аминокислот ($\text{CH}_3\text{-CONH-}\text{C}^{\alpha}\text{HR-CONH-CH}_3$). Вторая часть общей задачи состояла в выяснении влияния средних взаимодействий, т.е. взаимодействий между соседними по цепи остатками. Объектами исследования здесь могли служить любые природные олигопептиды. Цель третьей, завершающей части – изучение роли контактов между удаленными по цепи, но пространственно сближенными в глобуле остатками и априорный расчет трехмерной структуры белка. В дефинициях нелинейной неравновесной термодинамики эти цели могут быть сформулированы следующим образом. Во-первых, определение возможных конформационных флуктуаций у свободных аминокислотных остатков и выявление энергетически наиболее предпочтительных. Во-вторых, нахождение возможных конформационных флуктуаций локальных участков полипептидной цепи и установление среди них бифуркационных флуктуаций, ведущих к структурированию фрагментов за счет средних невалентных взаимодействий. В-третьих, анализ возможных флуктуаций лабильных по средним взаимодействиям участков полипептидной цепи и идентификация бифуркационных флуктуаций, обуславливающих комплементарные взаимодействия конформационно жестких нуклеаций, стабилизацию лабильных участков и, в конечном счете, образование нативной трехмерной структуры молекулы белка.

Таким образом, предполагается, что механизм структурной самоорганизации белка включает бифуркационные флуктуации трех ступеней. Флуктуации первой ступени отвечают низкоэнергетическим конформа-

ционными состояниями свободных остатков; второй ступени – низкоэнергетическим конформационным состояниям фрагментов цепи, являющихся сочетаниями бифуркационных флуктуаций первой ступени; флуктуации третьей ступени проявляются на завершающей стадии сборки белковой цепи. Следовательно, конечная нативная конформация белка, если не принимать во внимание ее динамические свойства, а рассматривать ее как бы встроенной в кристаллическую решетку, представляет собой застывшие бифуркационные флуктуации трех ступеней. Беспорядочно-поисковый процесс структурной самоорганизации белка – это селекция необратимых флуктуаций среди множества обратимых, причина возникновения которых обусловлена собственным тепловым движением атомных групп и вынужденным броуновским движением белковой молекулы.

Глава 3

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД К КОНФОРМАЦИОННОМУ АНАЛИЗУ

Один из пионеров современной стереохимии Д. Бартон около 40 лет назад отметил, что для "точного описания" молекул органических соединений надо знать "три К": конституцию, конфигурацию и конформацию [56]. Понятие "конституция" совпадает с понятием химического строения молекулы, т.е. ее валентной схемы. Конфигурация молекулы означает пространственное расположение атомов, обусловленное валентными силами, поэтому ее изменение сопряжено с разрывом химических связей. Конформация – это также расположение атомов в пространстве, но определяемое, помимо валентных, также невалентными силами. Влияние последних проявляется в искажении валентных углов и длин связей по сравнению с идеальными углами в невозмущенной конфигурации молекулы, инверсии ("выворачивании") пирамидальных структур и, прежде всего, в появлении особого вида стереоизомерии, вызванной заторможенным вращением вокруг ординарных связей. Конформации – это неидентичные геометрические формы, которые может принимать молекула без нарушения ее целостности, т.е. без разрыва химических связей. Повышение энергии молекулы из-за образования неблагоприятных невалентных контактов, следствием которого является деформация валентных углов и длин связей, принято называть "байеровским напряжением", а ведущее к изменению конформационного состояния молекулы – "питцевским напряжением".

Интерес к конформационной изомерии был впервые проявлен в конце XIX в. в работе Г. Заксе, где отмечалось, что шестичленные углеродные циклы могут быть представлены в виде двух неплоских форм (ванны и кресла), в которых все валентные углы равны тетраэдрическим [57, 58]. Спустя почти тридцать лет Э. Мор предположил, что две формы кресла замещенных циклогексана должны легко превращаться друг в друга

путем вращения вокруг простых связей, что исключает их разделение [56, 60]. В последующие двадцать лет конформационный анализ широкого распространения не получил. Перелом произошел лишь в 1950 г. после опубликования исследования Д. Бартона, посвященного различиям в химическом поведении замещенных циклогексанов с заместителями в экваториальном и аксиальном положениях [61]. Пронизывающая эту работу идея о зависимости скорости и характера химической реакции от конформации молекулы была быстро воспринята химиками как указание на существование нового, чисто физического фактора, который может оказывать воздействие на реакционную способность соединения.

Большое внимание привлекла к себе также публикация Д. Бартона и Р. Куксона, в которой излагались основы конформационного анализа и отмечалась особая роль в химии алифатических, ациклических и гетероциклических соединений предпочтительных по энергии конформаций. "Основной принцип конформационного анализа, — полагают авторы, — состоит в том, что физические и химические свойства молекулы могут быть поставлены в соответствие с ее предпочтительной конформацией" [62. С. 47]. Немного позднее Бартон, подводя итоги бурному становлению конформационного анализа в органической химии, приходит к следующему заключению: "Конформационный анализ может быть применен наиболее успешно к системам, содержащим конденсированные циклогексановые кольца; он превратился в общепринятую составную часть стереохимического исследования стероидных и тритерпеновых систем, так же как и теоретического рассмотрения такого рода соединений" [63. С. 160]. Говоря о применении конформационного анализа, Бартон, по-видимому, не случайно делает акцент на конденсированные циклические системы. Их конформеры, как правило, разделены высокими энергетическими барьерами и поэтому имеют время жизни, достаточное для независимого участия каждого из них в химической реакции. У молекул с линейными цепями барьеры обычно составляют несколько ккал/моль, и время жизни отдельной конформации равно всего лишь 10^{-11} – 10^{-14} с. В случае значительной предпочтительности по энергии одного из конформеров в химической реакции фактически участвует также одна пространственная форма молекулы. При наличии набора изоэнергетических конформеров и высокой скорости установления равновесия между ними молекула предстает в химической реакции как статистическое образование.

Открытие конформационной изомерии качественно изменило и усложнило содержание проблемы пространственного строения органических соединений. Для характеристики структурной организации молекулы, имеющей ординарные связи, уже недостаточно только знания статического распределения в пространстве атомов и стабилизирующих их системы валентных взаимодействий. При существовании у молекул ряда легко переходящих друг в друга конформаций такую информацию нужно иметь о каждой пространственной форме. Кроме того, необходимо знать положение конформационного равновесия, весьма чувствительного к изменению внешних условий, и систему взаимодействий валентно несвязанных атомов, которая по сравнению с системой валентных связей более сложна. Решить проблему структурной организации молекул с помощью одних

экспериментальных методов и эмпирического подхода представляется нереальным по принципиальным соображениям, поскольку она связана не только с интерпретацией наблюдаемых на опыте фактов, что само по себе довольно сложно, но и с количественной оценкой потенциальных возможностей молекулы. Там, где речь идет о выявлении скрытых особенностей системы, прерогатива теоретического подхода бесспорна.

3.1. МЕХАНИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

Конформация молекулы, как отмечалось, определяется взаимодействиями валентно несвязанных атомов. Поэтому при создании метода теоретического конформационного анализа, прежде всего, встал вопрос о способе количественной оценки энергии этих взаимодействий. Из двух альтернативных путей его решения – квантовомеханического и классического – первый должен быть исключен из-за громоздкости объектов исследования, особенно если иметь в виду молекулы белка. Многочисленные попытки Б. Пульмана и А. Пульман использовать в конформационном изучении пептидов полуэмпирические методы квантовой химии ограничились анализом лишь элементарных монопептидов [64]. Рассмотрен второй путь решения.

Классический подход к исследованию конформаций был предложен в 1946 г. Т. Хиллом [65] и независимо в том же году Ф. Уэстгеймером и Дж. Майером [66]. Существенный вклад в развитие теории метода атом-атомных невалентных взаимодействий, его применение и популяризацию внес А.И. Китайгородский [67–71]. Подход к оценке взаимодействий включает ряд отнюдь неочевидных допущений и с физической точки зрения не выглядит достаточно строгим. Его аппроксимация реальных внутримолекулярных взаимодействий базируется на механической модели, согласно которой молекула представляется системой точечных масс – атомов без учета их электронно-ядерной структуры и квантовой природы. Атомы соединены валентными связями, которые, как правило, предполагаются жесткими. Пространственное строение такой модели молекулы определяется разного рода взаимодействиями между всеми валентно несвязанными атомами в попарно-аддитивном приближении и ограниченной свободой вращения вокруг всех ординарных связей. Следовательно, предполагается, что взаимодействие между любой парой валентно-несвязанных атомов не зависит от внутримолекулярного окружения, т.е. имеет универсальный характер и определяется исключительно природой атомов и расстоянием между ними.

Межатомные невалентные взаимодействия подразделяются на ван-дер-ваальсовы, электростатические, торсионные и водородные связи. Каждый вид атом-атомных взаимодействий описывается полученной на основе полуклассических или классических предположений потенциальной функцией с системой параметров, подобранных эмпирически. Общая энергия невалентных взаимодействий $U_{\text{общ}}$ (конформационная внутренняя энергия молекулы) предполагается в соответствии с принципом Борна–Оппенгеймера (1927 г.) независимой от энергии валентных связей и пред-

ставляется аддитивной суммой энергетических вкладов отдельных видов взаимодействий: $U_{\text{общ}} = U_{\text{вдв}} + U_{\text{угл}} + U_{\text{торс}} + U_{\text{эл}} + U_{\text{вс}}$, где: $U_{\text{вдв}}$ – энергия невалентных ван-дер-ваальсовых взаимодействий; $U_{\text{угл}}$ – энергия деформации валентных углов; $U_{\text{торс}}$ – торсионная энергия вращения вокруг валентных связей; $U_{\text{эл}}$ – энергия электростатических взаимодействий; $U_{\text{вс}}$ – энергия водородных связей. Оптимальное конформационное состояние молекулы устанавливается в результате компромисса между всеми энергетическими составляющими всех пар валентно-несвязанных атомов. Валентные углы стремятся сохранить свои идеальные значения, отвечающие соответствующим гибридизациям атомов (sp^3 , sp^2), а валентно-несвязанные атомы – находиться на равновесных расстояниях, соответствующих минимумам потенциалов парных взаимодействий и торсионных потенциалов.

Широкое использование теоретического подхода на основе рассмотренной механической модели для анализа конформационных возможностей молекул органических соединений началось в первой половине 1960-х годов, когда представилась возможность переложить большой объем вычислений на ЭВМ. Во второй половине этого десятилетия теоретический конформационный анализ стал применяться для исследования пространственного строения монопептидов и регулярных полипептидов.

3.2. ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ФУНКЦИИ НЕВАЛЕНТНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ АТОМОВ

Ван-дер-ваальсовы взаимодействия. Это наиболее важный вид межатомных невалентных контактов, вносящий доминирующий вклад в конформационную энергию и во многих случаях практически полностью определяющий конформационные возможности молекулы. Они осуществляются между любыми двумя атомами (не образующими валентную связь), расположенными достаточно близко друг от друга, независимо от того, принадлежат ли одной молекуле или разным. Для расчета ван-дер-ваальсовых взаимодействий предложено большое число аналитических эмпирических зависимостей, подробное описание которых можно найти в монографиях и обзорах Э. Илиела и соавт. [72], К. Питцера [73], Ф. Уэстгеймера [74], А.И. Китайгородского [75, 76], Г. Шераги [77], Г. Рамачандрана и В. Сасисекхарана [78]. Теоретические аспекты этих взаимодействий детально освещены в книгах Р.В. Полозова [79] и В.Г. Дашевского [80].

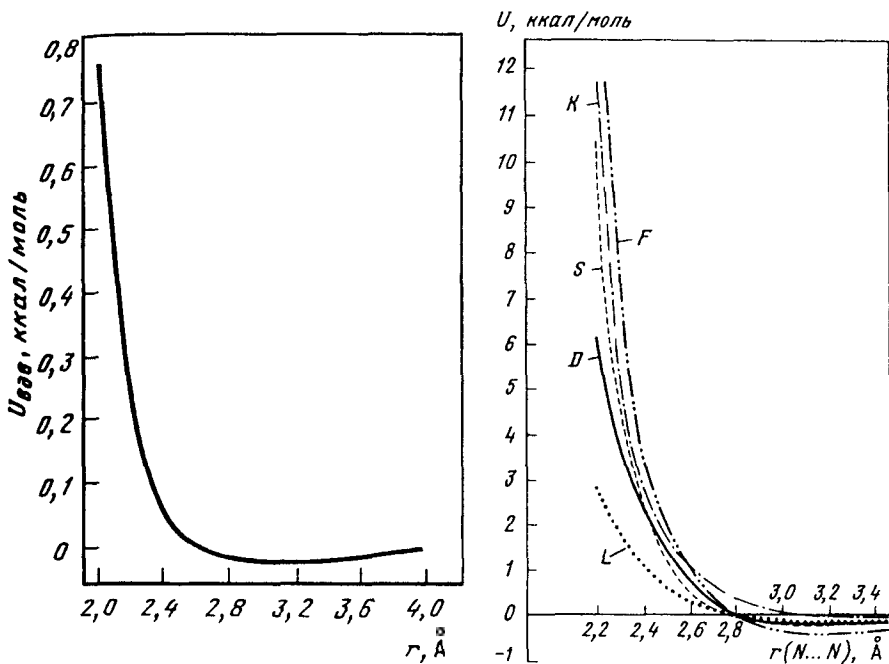
Ван-дер-ваальсовы межатомные взаимодействия ($U_{\text{вдв}}$) складываются из дисперсионного притяжения ($U_{\text{дисп}}$) и отталкивания ($U_{\text{от}}$) атомов. Квантовомеханическая теория сил притяжения была развита в 1937 г. Ф. Лондоном. Понижающие конформационную энергию дисперсионные, или лондоновские, силы есть результат взаимодействия мгновенных диполей, индуцированных поляризующим атомные системы движением внешних электронов. Они действуют между всеми атомами полярных и неполярных молекул, т.е. вне зависимости от наличия статического дипольного момента. Силы отталкивания возникают на малых расстояниях между

атомами, когда нарушается принцип Паули, запрещающий взаимное проникновение заполненных электронных орбиталей атомов.

Потенциальная кривая зависимости $U_{\text{вдв}}$ от r , где r – расстояние между парой валентно-несвязанных атомов, следует из анализа отклонений свойств реального и идеального газов. Исследования Т. Хилла [81], М. Кривого и Е. Мейзона [82] рассеяния молекулярных пучков позволили установить зависимость $U_{\text{вдв}}(r)$ для взаимодействий атомов инертных газов, которые были распространены на атомы соответствующих галоидов. Кривая $U_{\text{вдв}}$ как функция расстояния между атомами гелия представлена на рис. 1.2. На больших расстояниях действуют силы притяжения, энергия которых пропорциональна, согласно теории Лондона, $1/r^6$. На более коротких расстояниях при достаточном сближении атомов их ван-дер-ваальсовы радиусы перекрываются, и отталкивание между ядрами и между электронами доминируют над силами притяжения. Энергия отталкивания обычно аппроксимируется как $1/r^{12}$ или $\exp(-r)$. Таким образом, для описания невалентных взаимодействий наиболее широко используются две аналитические формы потенциала: потенциал Дж. Леннарда-Джонса ("6-12") $U_{\text{вдв}}(r) = (-A/r^6) + (B/r^{12})$ и потенциал А. Букингема ("6-эксп") $U_{\text{вдв}}(r) = -(A/r^6) + B \cdot \exp(-Cr)$, где A , B и C – эмпирические параметры. Потенциальные кривые Леннарда-Джонса и Букингема очень похожи; различие заключается лишь в том, что потенциал "6-эксп" имеет ложный минимум при $r < 1,0 \text{ \AA}$ и при $r = 0$ величина $U_{\text{вдв}}$ стремится к $-\infty$.

В ранних работах по конформационному анализу расчет проводился в предположении только сил отталкивания. В этом случае часто использовался метод контактных радиусов атомов r_0 , согласно которому конформация молекулы считалась реальной, если все межатомные расстояния оказывались больше или равными соответствующим суммам значений r_0 . Обращает на себя внимание то обстоятельство, что, несмотря на грубость такого приближения, метод позволяет получить достаточно удовлетворительное представление о конформационных возможностях молекул и может оказаться полезным при отборе исходных данных для последующего анализа структурных вариантов.

Основная проблема при использовании потенциальных функций заключается в выборе эмпирических параметров, в наибольшей мере соответствующих исследуемым объектам, поскольку универсальных параметров нет. Равновесные расстояния берутся прямо из кристаллографических данных. Дж. Хендриксон [83] и Г. Шерага и соавт. [84] разработали два способа определения параметров A , B и C в функциях "6-эксп" и "6-12". Параметр A вычисляется по уравнению Слэтера-Кирквуда, а B – из условий минимума функции $U_{\text{вдв}}$ при равновесном расстоянии. Другим возможным путем определения значений эмпирического параметра B является его оценка по данным рассеяния молекулярных пучков, а параметра A – из условия $(\delta U_{\text{вдв}}/\delta r)_{r=r_0} = 0$. Параметр C в функции Букингема во всех случаях предполагается одинаковым ($4,6 \text{ \AA}^{-1}$). Наиболее обоснованными и хорошо себя зарекомендовавшими в расчетной практике пептидов следует признать значения параметров A и B , предложенные Р. Скоттом и Г. Шерагой [85] для потенциала Леннарда-Джонса. Для потенциала



Р и с. 1.2. Потенциальная кривая зависимости энергий невалентных взаимодействий от расстояний между атомами гелия [72]

Р и с. 1.3. Потенциальные кривые энергий невалентных взаимодействий атомов азота

Букингема самые надежные параметры получены В.Г. Дашевским при анализе большого экспериментального материала, касающегося структурных и термодимических данных соответствующих модельных соединений [80]. Параметры потенциала "6-ср", описывающего взаимодействия разноименных атомов, определены с помощью комбинационных правил. Конформационные расчеты Дашевского и других авторов с использованием его параметров привели к хорошему совпадению результатов теории с экспериментальными данными рентгеноструктурного анализа большого числа ароматических и алифатических соединений, циклических углеводов и нитросоединений.

На рис. 1.3 сопоставлены потенциальные кривые энергий невалентных взаимодействий атомов азота, отвечающих разным потенциалам, а при совпадении потенциалов – разным наборам эмпирических параметров. Тем не менее, как видно из рисунка, различия между кривыми невелики. Потенциал Букингема с параметрами Д. Бранта и П. Флори (F) [86] по сравнению с потенциалом Леннарда-Джонса с параметрами Р. Скотта и Г. Шераги (S) [85] имеет более глубокий минимум и более крутой подъем энергии при $r < r_0$. Минимум потенциала А.И. Китайгородского (K) [75] отличается самым большим значением равновесного расстояния r_0 , а потенциал А. Ликвори и соавт. (L) [87] – медленным подъемом энергии в

области $r < r_0$. Практически совпадают друг с другом потенциальные кривые с параметрами Р. Скотта и Г. Шераги (S , потенциал "6-12") [85] и В.Г. Дашевского (D , потенциал "6- $\exp$ ") [80] в области $r \geq 2r_0/3$, наиболее интересной для конформационного анализа.

Деформация валентных углов. Энергия изменения валентных углов вызванная байеровским напряжением, рассчитывается в конформационном анализе по закону Гука: $U_{\text{угл}} = 0,5K_{\alpha} \cdot \Delta\alpha^2$, где: K_{α} – коэффициент упругости; $\Delta\alpha$ – отклонение валентного угла от идеального значения. В механической модели Китайгородского в качестве идеальных принимаются такие значения валентных углов, которые они имели бы согласно гибридизации центрального атома при отсутствии невалентных взаимодействий ($109^\circ 28'$ при sp^3 гибридизации, 120° – sp^2 и 180° – sp). Коэффициенты упругости в модели Китайгородского зависят от природы и гибридного состояния центрального атома. Величина K_{α} не равна спектроскопическим деформационным константам S_{α} , так как согласно теории колебаний внутренней координата $\Delta\alpha$ представляет собой отклонение угла от своего равновесного (а не идеального) значения. Поэтому с точки зрения конформационного анализа энергия $0,5 S_{\alpha} \Delta\alpha^2$ вблизи равновесия есть сумма энергии деформации угла и энергии невалентных взаимодействий атомов.

Деформация валентной схемы молекулы за счет невалентных взаимодействий в принципе может коснуться не только двугранных и валентных углов, но и химических связей. Вызванное этим изменение энергии также определяется с помощью закона Гука. Анализ рентгеноструктурных данных и результатов расчета геометрии молекул по вращательным спектрам, однако, указывает на значительную стабильность длин валентных связей. Их малая чувствительность к конформационным изменениям молекул объясняется большими значениями силовых постоянных, которые на 1–2 порядка больше угловых коэффициентов упругости. Длины связи менее стабильны в сильно перегруженных молекулах, у которых атомы, не образующие друг с другом химические связи, расположены на расстояниях, значительно меньших соответствующих сумм ван-дер-ваальсовых радиусов (r_0), и, следовательно, испытывают серьезные стерические отталкивания. Существенно отличаются длины связей в конденсированных ароматических соединениях. Ч. Коулсон показал, что этот факт обусловлен делокализацией π -электронов, вызванной стерическим напряжением [88]. Подобного рода аномалии, приводящие к изменению электронных конфигураций молекул, которые неизбежны при деформациях длин связей, как правило, самых консервативных молекулярных характеристик, вступают в противоречие с основным постулатом классического конформационного анализа о независимости невалентных и валентных взаимодействий атомов (принцип Борна–Оппенгеймера). В механической модели Китайгородского химические связи предполагаются жесткими. Расчеты М. Биксона и С. Лифсона показали, что энергия изменения длин связей в подавляющем большинстве случаев очень мала и может не учитываться в анализе конформаций [89].

Электростатические взаимодействия. В простейшем классическом варианте энергия этих взаимодействий рассчитывается в монопольном

приближении по формуле Кулона: $U_{эл} = (e_i \cdot e_j) / (\epsilon \cdot r_{ij})$, где: e_i, e_j – точечные парциальные заряды на атомах; r_{ij} – расстояние между атомами; ϵ – диэлектрическая проницаемость. Другой возможный подход к оценке величины $U_{эл}$, также классический, может строиться на основе диполь-дипольного приближения. В этом случае энергия электростатического взаимодействия двух диполей выражается уравнением, предложенным Дж. Джинсом [90. С. 377]:

$$U_{эл} = \frac{\mu_i \cdot \mu_j}{\epsilon \cdot r_{ij}^3} (\cos \chi + 3 \cos \alpha_i \cdot \cos \alpha_j),$$

где: μ_i, μ_j – дипольные моменты связей и атомных групп; r_{ij} – расстояние между центрами диполей; χ, α_i, α_j – углы, определяющие взаимную ориентацию диполей. Как и в предыдущей формуле, ϵ – диэлектрическая проницаемость. Однако эта макроскопическая характеристика, используемая на молекулярном уровне, как показали Дж. Кирквуд и Ф. Уэстгеймер [91], в значительной мере теряет свой первоначальный смысл и в приведенных уравнениях является лишь эффективным параметром, подбираемым эмпирически.

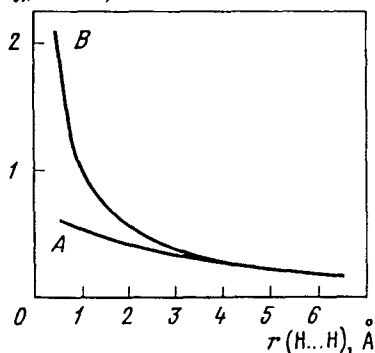
Диполь-дипольное приближение было использовано Брантом и Флори в расчете энергии электростатических взаимодействий полипептидной цепи [86]. Предполагалось, что вектор эффективного дипольного момента пептидной группы равен по абсолютной величине 3,7 D и проходит через центр связи N–C(O), образуя с ней угол 56°. Однако учет электростатических взаимодействий с помощью дипольных моментов неудовлетворителен при небольших расстояниях. Было показано, что при $(r_{ij}/l) < 2$ (l – длина диполя) такое приближение приводит к результатам, существенно отличающимся от наблюдаемых экспериментально. Поскольку в конформационном анализе молекул рассматриваются взаимодействия атомов или атомных групп главным образом на близких расстояниях, то условие $(r_{ij}/l) < 2$ не соблюдается и диполь-дипольное приближение использовать нельзя. Монопольный подход позволяет точнее рассчитывать энергию электрических взаимодействий. Но здесь встает вопрос принципиального порядка, касающийся правомерности самого классического подхода к решению обсуждаемой задачи, точнее, физического смысла аппроксимации размазанных в пространстве электронных облаков точечными зарядами.

На рис. I.4 приведены зависимости энергии от расстояния между двумя точечными зарядами и между двумя электронными облаками атомов водорода, описываемыми ψ функциями 1s и 2s электронов атомов водорода, т.е. интегралом:

$$\int \frac{\psi_{1s}^2(1) \psi_{2s}^2(2)}{r_{12}} d\tau_1 d\tau_2.$$

При межатомных расстояниях $r_{12} > 2,0 \text{ \AA}$ оба результата совпадают. Следовательно, вплоть до значения r , соответствующего 60–70% суммы ван-дер-ваальсовых радиусов атомов водорода, точное приближение яв-

$U_{\text{эл}}, \text{ ккал/моль}$



Р и с. 1.4. Зависимости энергий взаимодействия от расстояния между двумя электронными облаками (А) и двумя точечными зарядами (В) атомов водорода

ляется удовлетворительным. Расстояние $\sim 2\text{Å}$ равно приблизительно четырем радиусам максимальной плотности атома водорода ($R_{\text{макс}}$). Можно полагать, что в случае других атомов для описания электростатических взаимодействий следует пользоваться законом Кулона в его простейшей форме, начиная с $r = 4R_{\text{макс}}$. Для слэтеровской функции $2p$ водородоподобного атома

$R_{\text{макс}} = 4a_0/Z'$, где: a_0 – борковский радиус; Z' – эффективный заряд. Для атома углерода $Z' = 3,25$ и $4R_{\text{макс}} = 2,5\text{Å}$, т.е. опять те же 60–70% от суммы ван-дер-ваальсовых радиусов двух атомов углерода. Поскольку более короткие контакты между атомами в конформационном анализе молекул, как правило, интереса не представляют, точечное приближение оправдано.

Парциальные заряды на атомах чаще всего находятся из дипольных моментов связей, которые, в свою очередь, получаются путем векторного разложения дипольного момента молекулы с привлечением моментов соответствующих модельных соединений и аналогов. Подобный подход к выбору зарядов является очень приближенным в силу неоднозначности разложения дипольного момента молекулы по направлениям связей. Кроме того, центр заряда не совпадает с центром ядра, особенно у атомов с неподеленными электронными парами (например, N, O), которые вносят существенный вклад в общий дипольный момент молекулы.

На атомах амидной группы распределение зарядов впервые было получено Р. Курландом и Э. Вильсоном для простейшей молекулы формамида с помощью связевых моментов [92]. При определении последних использованы компоненты дипольного момента формамида вдоль его главных осей инерции, известные из измерений эффекта Штарка; геометрические параметры, найденные авторами из микроволновых вращательных спектров, и перенесенные из других молекул дипольные моменты связей. Д. Поланд и Г. Шерага использовали для определения зарядов на атомах амидной и сложноэфирной групп квантовомеханический метод [93]. Общий заряд на каждом атоме рассматривался в виде суммы σ - и π -зарядов. При этом σ -заряды были вычислены методом МО–ЛКАО в варианте Дель Ре, а π -заряды оценены из экспериментальной величины и направления общего дипольного момента молекулы. Е.М. Поповым и В.Н. Желтовой заряды на атомах амидной группы оценены путем теоретического анализа интенсивностей инфракрасных полос поглощения формамида и его изотопозамещенных [94]. Свойства пептидной (амидной) группы подробно обсуждаются в главе 4, а сейчас отметим, что ее электронная структура отличается чрезвычайной лабильностью. Поэтому

можно ожидать значительной вариации зарядов на атомах под действием многих факторов: водородного связывания, диполь-дипольного взаимодействия, индуктивного эффекта и т.д. Если иметь в виду пептиды и белки, то вряд ли можно надеяться на хорошее знание величин парциальных зарядов атомов и, следовательно, на достаточно точную оценку электростатических взаимодействий.

Другая серьезная проблема, возникающая при учете электростатических взаимодействий, связана с диэлектрической проницаемостью ϵ . Выше отмечалось, что этот параметр характеризует макроскопическое свойство среды ослаблять взаимодействие зарядов, находящихся на большом расстоянии друг от друга. В конформационном анализе одной молекулы такая трактовка параметра ϵ , строго говоря, теряет смысл. Тем не менее от использования диэлектрической проницаемости не отказались и вводят в расчет в виде эмпирического параметра, величина которого может существенно отличаться от величины известной физической константы. Определение ϵ , используемой в конформационном анализе, связано с большими трудностями и вряд ли является однозначным. В отсутствие молекул растворителя в промежулке между близко расположенными атомами значение диэлектрической проницаемости определяется поляризуемостью взаимодействующих атомов и полем, создаваемым окружающими атомами и молекулами растворителя. Для неполярной среды Брант и Флори рекомендуют величину $\epsilon = 3,5$ [86]. Выбор был сделан при сопоставлении результатов конформационного анализа полипептидов с опытными данными. В работе Скотта и Шераги, посвященной конформационному анализу регулярных структур полипептидов, значение ϵ варьируется от 1 до 4, что, однако, мало сказывается на профиле потенциальной поверхности [85]. Учитывая величину диэлектрической проницаемости в алкиламидах ($\epsilon = 4$), значения от 1 до 4 можно считать разумными при оценке электростатических взаимодействий атомов полипептидов в неполярных средах. В случае водных растворов значение $\epsilon_{эф}$ должно быть больше, так как для самой воды $\epsilon = 81$ и, что весьма важно, вода при образовании водородных связей оттягивает на себя заряды атомов амидной группы. С. Кримм и Дж. Марк в расчете конформаций полипептидов с заряженными группами в водной среде использовали величину ϵ , равную 10 [95]. В работе Е.М. Попова и соавт. [96] была рассмотрена возможность учета влияния растворителя на конформационное равновесие низкомолекулярных пептидов в рамках механической модели. Наилучшее совпадение с экспериментальными данными было получено при $\epsilon = 4$ для растворов в CCl_4 , $\epsilon = 6-7$ — $CHCl_3$ и $\epsilon = 10$ — H_2O .

Низкая точность в определении зарядов на атомах и неопределенность параметра $\epsilon_{эф}$ (значение которого, помимо сказанного выше, должно быть чувствительно также к расстоянию между зарядами), естественно, сказываются на величинах рассчитываемой энергии электростатических взаимодействий. Следует, однако, иметь в виду, что по сравнению с энергией ван-дер-ваальсовых невалентных взаимодействий электростатическая составляющая изменяется с расстоянием очень плавно (пропорционально $1/r$). Поэтому она не может привести к заметному изменению геометрических параметров оптимальных конформаций, но может суще-

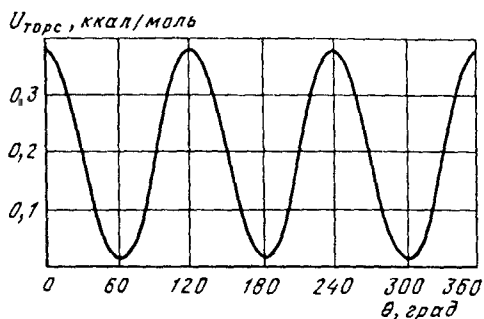


Рис 15 Зависимость торсионной энергии этана от двугранного угла вращения (θ) при учете ван-дер-ваальсовых взаимодействий

ственно повлиять на значение конформационной энергии и, следовательно, положение равновесия конформеров.

Торсионные взаимодействия. Впервые предположение о заторможенности вращения вокруг связи С–С в этане бы-

ло высказано в 1929 г. Л. Эбертом [97]. Вскоре также до появления соответствующих экспериментальных данных это явление было исследовано теоретически Г. Эйрингом путем оценки ван-дер-ваальсовых сил притяжения и отталкивания валентно-несвязанных атомов водорода [98]. Принимая длину связи С–С равной 1,54 Å, а длину С–Н 1,13 Å и считая валентные углы тетраэдрическими, Эйринг получил зависимость энергии $U_{\text{торс}}$ от двугранного угла вращения θ , представленную на рис. 15. Энергия отталкивания имеет наибольшее значение при затененном положении атомов водородов метильных групп этана (*цис*-форме). При изменении угла θ от 0 до 60° энергия отталкивания уменьшается приблизительно на 0,3 ккал/моль, что и будет считаться потенциальным барьером вращения этана. В 1936 г. Дж. Кемп и К. Питцер, выполнив более прецизионный расчет этана с учетом энтропии вращения, нашли значение потенциального барьера вокруг С–С равным 3,15 ккал/моль [99]. Они же впервые использовали формулу потенциала энергии торсионных взаимодействий $U_{\text{торс}} = 1/2U(1 - \cos 3\theta)$, которая с тех пор стала широко использоваться в расчетах подобного рода. Значение барьера 3,15 ккал/моль, полученное теоретически, оказалось близким опытной величине (2,75 ккал/моль), которую установили спустя два года Г. Кистяковский и соавт. [100] при определении теплоемкости этана. В 1949 г. Л. Смит впервые получил в результате исследования инфракрасного спектра поглощения этана однозначное доказательство о принадлежности предпочтительной конформации этой молекулы к точечной группе симметрии D_{3d} , т.е. пространственной форме с трансoidным положением связей С–Н метильных групп [101].

Со временем более распространенными объектами исследования внутреннего вращения становятся галогидпроизводные этана. Они имели то преимущество перед незамещенным этаном, что предоставляли для своего изучения большой набор данных, полученных с помощью различных физико-химических методов: дипольные моменты [102], раман- и ИК-спектроскопия [103–106], электронография [107, 108], рентгеноструктурный анализ [109]. В 1951 г. с помощью последнего М. Милбергом и У. Липкомбом было показано, что все молекулы кристаллического 1,2-дихлорэтана находятся в *транс*-форме. Электронографический метод задолго до этого дал доказательства в пользу существования *транс*-формы как основной в его парах [107]. В исследовании тем же методом Дж. Эйнс-

ворта и Дж. Керла паров 1,2-дихлорэтана найдено, что угол поворота *gauche*-формы (промежуточной между *транс*- и *цис*-) относительно *транс*-формы составляет около 110° , а не 120° , как принималось ранее, причем при 22° ее имеют приблизительно 30% молекул [108].

Параллельно с экспериментальным исследованием конформаций этана и его производных проводилось, хотя и менее успешно, теоретическое изучение внутреннего вращения атомных групп. В 1954 г. С. Мидзусима, анализируя существующие гипотезы о природе потенциала торможения, писал, что "...до сих пор не существует убедительной и хорошо разработанной теории, которая объясняла бы количественно потенциальные барьеры, препятствующие внутреннему вращению" [102. С. 71]. Тремя годами позднее Э. Уилсон высказал предположение о том, что потенциальный барьер должен "... некоторым образом представлять свойство, присущее самой осевой связи, и не должен быть обязан в сколько-нибудь значительной мере прямым силам между примыкающими к ней атомами или теми частями электронного облака, которые относительно удалены от этой связи" [110. С. 819]. Представление о том, что эффект "... действует через связь C—C и возникает вследствие недостатка вращательной симметрии у этой связи", было постулировано еще в 1940 г. А. Лэнгсетом и соавт. [111. С. 416]. С такой трактовкой не согласен Л. Полинг, который разработал теорию, объясняющую потенциальный барьер вращения наличием обменного взаимодействия электронных облаков валентных связей, примыкающих к аксиальной связи [112, 113]. Л. Полинг предположил, что в обменном взаимодействии, помимо электронов в *s*- и *p*-состояниях, участвуют также электроны в *f*- и *d*-состояниях. Многочисленные квантовомеханические расчеты потенциальных барьеров у этаноподобных молекул, проведенные самим Л. Полингом, а также Г. Эйрингом, Г. и Ф. Харрисами, К. Питцером и У. Липкомбом и др. [1958–1967 гг.) с учетом и без учета *d*- и *f*-электронных состояний, не привели к однозначным результатам. Строгий расчет затруднен тем обстоятельством, что высота потенциального барьера в квантовомеханических расчетах представляет собой малую разность очень больших величин.

Помимо электронной асимметрии аксиальной ординарной связи и обменного взаимодействия для объяснения потенциального барьера привлекались также электростатические диполь-дипольные взаимодействия электронных облаков противостоящих связей, квадруполь-квадрупольные взаимодействия, включающие еще и электронное облако центральной связи, и взаимодействия валентно-несвязанных атомов. Учет каждого из этих эффектов приводил к заниженным значениям барьеров. Р. Скотт и Г. Шерага в 1966 г. предложили полуэмпирический метод расчета величины барьеров, включающих вклады от стерических и обменных взаимодействий [85]. Авторы отошли от описания только этаноподобных молекул и предложили потенциальные функции торсионных взаимодействий для всех связей полипептидной цепи. Барьеры вращения вокруг связи $N-C^\alpha(\phi)$ и $C^\alpha-C'(\psi)$ аминокислотного остатка ($-HN-C^\alpha HR-C'O-$) были оценены по экспериментальным данным соответствующих карбонильных соединений (CH_3COX , где X – различные заместители). В результате

Скотт и Шерага для потенциальных барьеров U_0^ϕ и U_0^ψ получили значения соответственно 0,6 и 0,2 ккал/моль. Г. Рамачандран и В. Сасисекхаран оценили эти барьеры в 1,0 и 0,5 ккал/моль [78], а Д. Брант и П. Флори – 1,5 и 1,0 ккал/моль [86]. Де Сантис и соавт. [87] предполагают вращение вокруг связей $N-C^\alpha(\phi)$ и $C^\alpha-C'(\psi)$ практически свободным и в своих расчетах регулярных конформаций пептидной цепи вообще не учитывают вклад торсионных взаимодействий.

Для вращения вокруг связей $N-C^\alpha$ и $C^\alpha-C'$ Скотт и Шерага [85] предложили потенциалы $U_{\text{торс}}^\phi = 0,3(1 + \cos 3\phi)$ и $U_{\text{торс}}^\psi = 0,1(1 + \cos 3\psi)$. Минимумы энергии согласно существующей номенклатуре [114] у потенциала $U_{\text{торс}}^\phi$ находятся при $\phi = 0; 120; -120^\circ$, а у $U_{\text{торс}}^\psi$ – при $\psi = 60; 180$ и -60° . Для вращения вокруг связей $C^\alpha-C^\beta(\chi^1)$ боковых цепей аминокислотных остатков авторы предложили потенциал $U_{\text{торс}}^{\chi^1} = 1,4(1 + \cos 3\chi^1)$.

Величина потенциального барьера $U_0^{\chi^1}$ принята, как и в этане, равной 2,8 ккал/моль. Максимумы функции $U_{\text{торс}}^{\chi^1}$ отвечают затененному положению связей $N-C^\alpha$ и $C^\beta-C^\chi$ ($\chi^1 = 0, 120, -120^\circ$). При вращении ароматических групп аминокислотных остатков Phe, Tyr, Trp и His вокруг связи $C^\beta-C^\gamma(\chi^2)$ используется потенциал $U_{\text{торс}}^{\chi^2} = 0,3(1 + \cos 6\chi^2)$. Максимумы торсионной энергии находятся при значениях $\chi^2 = 0, 60, 120, 180, -120, -60^\circ$, отвечающих затененным ориентациям связей $C^\alpha-C^\beta$ и $C^\gamma-C^\delta$.

Вращение вокруг частично кратной пептидной связи $N-C'(\omega)$ описывается потенциальной функцией второго порядка $U_{\text{торс}}^\omega = 9,0(1 + \cos 2\omega)$ или при небольших изменениях угла ω : $U_{\text{торс}}^\omega = 18,0 \cdot \sin 2\omega$. Г. Рамачандран и В. Сасисекхаран на основе данных ЯМР производных формамида и ацетамида определили значение потенциального барьера U_0^ω в 20 ккал/моль [78]. Более поздние спектральные измерения привели к несколько меньшим величинам U_0^ω (14,0–18,0 ккал/моль) [84].

Водородные связи. Существующие точки зрения на природу водородных связей основываются главным образом на двух ее теоретических трактовках – электростатической и донорно-акцепторной. Электростатическая модель, предложенная Полингом в 1928 г., основывается на принципе Паули, валентной схеме химической связи и классическом правиле валентности, согласно которым атом водорода, обладающий единственным $1s$ электроном, не может образовывать более одной ковалентной связи [115]. Отсюда делается вывод, что возникновение водородного связывания обусловлено ионными силами. Экспериментально эта аргументация подтверждается тем, что прочная водородная связь в системе $RXH...YR$ образуется в том случае, когда X и Y – наиболее электроотрицательные атомы (F, O и др.). Расчеты различных вариантов модели с точечным распределением зарядов приводили к величинам энергии H-связи, совпадающим с опытными значениями [116–119].

Полярная модель водородной связи, однако, противоречила многим хорошо известным экспериментальным фактам. Ее несовершенство Ч. Коулсон увидел в том, что модель не объясняла резкого увеличения абсолютной интенсивности и полуширины ИК-полос поглощения валентных колебаний ОН- и NH-групп, отсутствие корреляции между энергией Н-связей и дипольным моментом основания и целый ряд других проявлений водородной связи. Трудно с помощью электростатической модели, например, согласовать слабую Н-связь, образуемую ацетонитрилом (дипольный момент 3,44 D), и сильную Н-связь, образуемую триметиламином (0,7 D). С представлением, что кислота А-Н образует водородную связь с основанием В посредством электростатических взаимодействий точечных зарядов, нельзя понять, почему ацетон, диэтиловый эфир и диоксан с дипольными моментами 2,85, 1,15 и 0,4 D соответственно образуют примерно одинаковые водородные связи [120].

К мысли о том, что электростатическая концепция Полинга недостаточна для объяснения явления образования Н-связи, еще раньше (1947 г.) пришел Н.Д. Соколов [121–123]. Согласно его донорно-акцепторной теории, водородная связь $RXH...YR$ возникает вследствие электронной делокализации, вызванной смещением неподеленной пары электронов от атома-донора Y к атому водорода – акцептору Н. Сила водородной связи и, следовательно, уменьшение энергии всей системы при ее возникновении определяются, с одной стороны, донорной способностью $Y = O, N, F, \dots$, которая у атома с неподеленной парой электронов будет, очевидно, тем больше, чем значительней величина его отрицательного заряда, а с другой – акцепторной способностью водорода, которая пропорциональна степени его протонизации, т.е. величине положительного заряда атома Н. Таким образом, теория водородной связи Соколова включает в себя две поначалу альтернативные трактовки. Для образования Н-связи атом водорода должен иметь большой положительный заряд, который в некоторых случаях, например, в молекуле воды, возникает в процессе взаимодействия за счет смещения электронного облака от Н к Х. При этом электроны атома Y будут стремиться занять частично освобождаемую орбиталь, нейтрализуя положительный заряд водорода. В соответствии с донорно-акцепторной теорией сила водородной связи зависит не столько от полярности связей $X-H$ и $Y-R$, сколько от их способности к взаимной поляризации и от потенциала ионизации неподеленной пары электронов атома Y.

Для расчета энергии водородной связи существует еще один подход – эмпирический, где вопросы теории как бы отступают на второй план, а на первый выходит практическая цель – возможность получать расчетные значения, разумно совпадающие с экспериментальными данными. Авторы первого эмпирического потенциала Э. Липпинкотт и Р. Шредер нашли выражение $U_{\text{вс}}$ для водородных связей $OH...O, NH...O, NH...N$ и т.д. при рассмотрении взаимодействий двухатомных молекул $X-H$ и $H-Y$ [124, 125]. Ими получена потенциальная функция, которая состоит из четырех членов ($U_{\text{вс}} = U_{\text{вс}}^1 + U_{\text{вс}}^2 + U_{\text{вс}}^3 + U_{\text{вс}}^4$). Первый член имеет вид:

$$U_{\text{вс}}^1 = D_0 \{1 - \exp[-n(r - r_0)^2 / 2r]\},$$

где: r – межатомное расстояние Х–Н при наличии Н-связи; r_0 – равновесное расстояние Х–Н при отсутствии Н-связи; D_0 – энергия диссоциации связи Х–Н; n – эмпирический параметр. Второй член ($U_{\text{вс}}^2$) имеет тот же вид, что и $U_{\text{вс}}^1$, но относится к связи Н–У и содержит величины r^* , r_0^* , D_0^* , n^* которые для связи Н–У обозначают то же, что r , r_0 , D_0 и n для связи Х–Н. Остальные два слагаемых потенциала $U_{\text{вс}}$ ($U_{\text{вс}}^3$ и $U_{\text{вс}}^4$) отражают ван-дер-ваальсово отталкивание и электростатическое взаимодействие атомов Х и У:

$$U_{\text{вс}}^3 + U_{\text{вс}}^4 = X \cdot \exp(-bR) - Y \cdot R^{-m},$$

где: R – расстояние Х...У; остальные члены – произвольные коэффициенты. Потенциальная функция Липпинкотта и Шредера содержит десять параметрических переменных, подбираемых эмпирически. Функция вскоре была модифицирована У. Маултоном и Р. Кромхаутом введением угловой зависимости энергии водородной связи в форме $\cos\theta^\circ$, учитывающей взаимную ориентацию связи Х–Н и линии Х...У, а также Н...У и Х...У [126].

Потенциал Липпинкотта и Шредера, еще более усложненный угловой зависимостью, нельзя считать удовлетворительным не только из-за его громоздкости, но и по другим причинам. Во-первых, он содержит много эмпирических параметров, которые не имеют ясного физического смысла и не могут быть надежно определены из опытных данных. Во-вторых, при $r^* > r_0^*$ функция $U_{\text{вс}}$ имеет плавный характер, а при $r^* \rightarrow \infty$ энергия водородной связи стремится не к нулю, а к 2 ккал/моль. В-третьих, потенциал нечувствителен к слабым водородным связям.

Де Сантис и соавт. [87] при изучении пространственного строения полипептидов использовали потенциальную функцию водородной связи У. Штокмайра, полученную при изучении взаимодействий между полярными молекулами [127]:

$$U_{\text{вс}} = 4D[(\sigma/r)^{12} - (\sigma/r)^6] - [(\mu_1\mu_2/r^3)2\cos\theta_1\cos\theta_2 - \sin\theta_1\sin\theta_2\cos(\varphi_1 - \varphi_2)],$$

где: D – энергия диссоциации водородной связи; σ – эмпирическая константа; φ_1 и φ_2 – азимутальные ориентации диполей. Первый член выражения отражает вклад энергии невалентных взаимодействий между полярными группами, второй – вклад энергии электростатических взаимодействий между диполями ρ_1 и ρ_2 , находящимися на атомах Н и О и направленными вдоль связей Н–Н и С=О. Углы θ_1 и θ_2 определяются наклоном диполей по отношению к линии, соединяющей центры диполей.

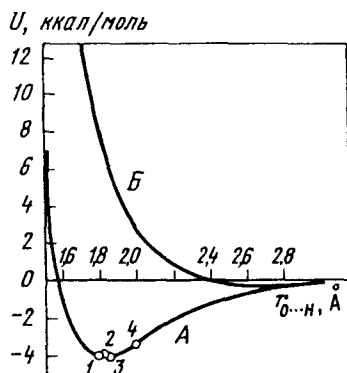
Д. Поланд и Г. Шерага предложили потенциал водородной связи вида:

$$U_{\text{вс}} = [(d/r^{12}) - (C/r^6) + S'(r)],$$

где: d и C – эмпирические параметры, первый член имеет форму потенциала Леннарда–Джонса, а второй – представляет собой электростати-

Рис. 1.6. Потенциалы водородной связи N—H...O (А) и ван-дер-ваальсовы взаимодействия атомов Н и О (Б) [130]

Точки 1—4 на кривой А — экспериментальные данные: 1 — метилацетамид, 2 — метилформамид, 3 — ацетамид, 4 — ацетилсалицилат



ческий вклад в энергию водородной связи, оцененный в монополярном приближении [93].

Рассматривая водородную связь как донорно-акцепторное взаимодействие, мы [128] аппроксимировали потенциальную функцию простым соотношением, предложенным П. Морзе в качестве энергетической функции химической связи [129]:

$$U_{\text{вс}} = D[1 - \exp(-n\Delta r)]^2 - D,$$

где: D — энергия диссоциации водородной связи; $\Delta r = r - r_0$ — разность между текущей и равновесной длинами водородной связи $\text{H}\dots\text{Y}$; n — эмпирический параметр. Потенциал при $n = 3 \text{ \AA}^{-1}$ удовлетворительно описывает энергию водородной связи в пептидах. Кривая $U_{\text{вс}}$ Н-связи N—H...O при значениях $D = 4,0 \text{ ккал/моль}$, $r_0 = 1,8 \text{ \AA}$ и $n = 3 \text{ \AA}^{-1}$ показана на рис. 1.6. При увеличении значения r функция асимптотически стремится к нулю; в области $2,7\text{--}2,9 \text{ \AA}$ она практически совпадает с энергетической функцией ван-дер-ваальсовых взаимодействий атомов О и Н, что позволяет использовать ее в качестве универсального потенциала взаимодействия между этими атомами в пептидах. Электростатический вклад автоматически учитывается здесь эмпирическим параметром D . Варьируя значение параметра D , можно получить потенциал, описывающий водородное связывание в различных средах. В выражении $U_{\text{вс}}$ нет члена, учитывающего угловую зависимость водородной связи. Его отсутствие неслучайно и имеет свое экспериментальное и теоретическое обоснование. Л. Полинг, проанализировав большое количество опытных данных, пришел к выводу, что водородная связь в пептидах не имеет четко выраженного направления [130]. А.И. Китайгородский полагал, что направление водородной связи определяется не ориентацией соответствующих орбиталей, а ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями атомов, которые, как правило, не вступают в противоречие с оптимальными условиями для образования водородной связи [75]. Это предположение нашло подтверждение в расчетах, результаты которых рассматриваются в этой книге. Было показано, что водородная связь не может конкурировать с более мощными ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями и влиять заметным образом вопреки им на молекулярную структуру.

1. Попов Е.М., Решетов П.Д., Липкин В.М. и др. Проблема белка. Т. 1. Химическое строение белка. М.: Наука, 1995.
2. Попов Е.М., Демин В.В., Шибанова Е.Д. Проблема белка. Т. 2. Пространственное строение белка. М.: Наука, 1996.
3. Садилов В.С. Проблемы белка. Л.: Ленснбтехиздат, 1933.
4. Фишер Э. Избранные труды. М.: Наука, 1979.
5. Fasman G.D. Poly- α -amino acids. N.Y.: Dekker, 1967.
6. Eddington A. The nature of the physical world. Ann Arbor: Univ. of Mich. press, 1958.
7. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. Т. 1. М.: Мир, 1986.
8. Wertz D.H., Scheraga H.A. // *Macromolecules*. 1978. Vol. 11. P. 9–15.
9. Lattman E.E., Rose G.D. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1993. Vol. 90. P. 439–441.
10. Creighton T.E. // *Biochem. J*. 1990. Vol. 270. P. 1–16.
11. Fersht A.R. // *FEBS Lett*. 1993. Vol. 325. P. 5–16.
12. Brandts J.F. // *J. Amer. Chem. Soc*. 1964. Vol. 86. P. 4291–4301.
13. Брандтс Дж.Ф. // Структура и стабильность биологических макромолекул. М.: Мир, 1973. С. 174–254.
14. Jaenicke R. // *Biochemistry*. 1991. Vol. 30. P. 3147–3160.
15. Baldwin R.L. // *Trends Biochem. Sci*. 1989. Vol. 14. P. 291–294.
16. Dill K.A. // *Biochemistry*. 1985. Vol. 24. P. 1501–1509.
17. Bowie J.U., Sauer R.T. *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1989. Vol. 86. P. 2152–2156.
18. Dill K.A. // *Biochemistry*. 1990. Vol. 29. P. 7135–7155.
19. Ohgushi M., Wada A. // *FEBS Lett*. 1983. Vol. 164. P. 21–24.
20. Pitzyan O.B. // *J. Protein Chem*. 1987. Vol. 6. P. 273–293.
21. Kuwajima K. // *Proteins*. 1989. Vol. 6. P. 87–103.
22. Лим В.И. // *Биофизика*. 1974. Т. 19. С. 562–575.
23. Chothia C., Levitt M., Richardson D. // *J. Mol. Biol*. 1981. Vol. 145. P. 215–250.
24. Kim P.S., Baldwin R.L. // *Annu. Rev. Biochem*. 1982. Vol. 51. P. 459–489.
25. Karplus M., Weaver D.L. // *Nature*. 1976. Vol. 260. P. 404–406.
26. Bashford D., Cohen F.E., Karplus M. et al. // *Proteins*. 1988. Vol. 4. P. 211–227.
27. Chothia C., Finkelstein A.V. // *Annu. Rev. Biochem*. 1990. Vol. 59. P. 1007–1039.
28. Moulton J., Unger R. // *Biochemistry*. 1991. Vol. 30. P. 3816–3824.
29. Creighton T.E. // *Progr. Biophys. and Mol. Biol*. 1978. Vol. 33. P. 231–297.
30. Creighton T.E. // *Biophys. Chem*. 1988. Vol. 31. P. 155–162.
31. Serrano L., Kellis J.T., Cann T. et al. // *J. Mol. Biol*. 1992. Vol. 224. P. 783–804.
32. Serrano L., Matouschek A., Fersht A.R. // *Ibid*. P. 847–859.
33. Fersht A.R., Serrano L. // *Curr. Opin. Struct. Biol*. 1993. Vol. 3. P. 75–83.
34. Томпсон Дж.М.Т. Неустойчивости и катастрофы в науке и технике. М.: Мир, 1985.
35. Белинцев Б.Н. // *Успехи физ. наук*. 1983. Т. 141. С. 55–101.
36. Эйген М., Шустер П. Гиперцикл. М.: Мир, 1982.
37. Szent-Györgyi A. Introduction to a submolecular biology. N.Y.: Acad. press, 1960.
38. Попов Е.М. Структурная организация белков. М.: Наука, 1989.
39. Попов Е.М. Структурно-функциональная организация белков. М.: Наука, 1992.
40. Попов Е.М. // *Молекуляр. биология*. 1975. Т. 9. С. 578–593.
41. Porov E.M. // *Intern. J. Quant. Chem*. 1979. Vol. 16. P. 707–737.
42. Попов Е.М. // *Молекуляр. биология*. 1985. Т. 19. С. 1107–1138.
43. Пригожин И. От существующего к возникающему. М.: Мир, 1985.
44. Bernal J.D., Flower R.H. // *J. Chem. Phys*. 1933. Vol. 1. P. 515–521.
45. Nemethy G., Scheraga H.A. // *Ibid*. 1962. Vol. 36. P. 3382–3400.
46. Kauzman W. // *Adv. Protein Chem*. 1959. Vol. 15. P. 1–63.
47. Волькенштейн М.В. Конфигурационная статистика полимерных цепей. М.: Изд-во АН СССР, 1959.
48. Бириштейн Т.М., Птицын О.Б. Конформация макромолекул. М.: Наука, 1964.
49. Флори П. Статистическая механика цепных молекул. М.: Мир, 1971.
50. Лифшиц И.М. // *ЖЭТФ*. 1968. Т. 55. С. 2408–2416.
51. Lumry R., Eyring H. // *J. Phys. Chem*. 1954. Vol. 58. P. 110–120.
52. Шредингер Э. Что такое жизнь с точки зрения физика? М.: Атомиздат, 1972.

53. Pauling L., Corey R.B. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1951. Vol. 37. P. 235–285.
54. Watson J.D., Crick F.H.C. // Nature. 1953. Vol. 171. P. 737–738.
55. Phyllips D.C. // Sci. Amer. 1966. N 11. P. 78–90.
56. Барто́н Д.Г.Р. Перспективы развития органической химии. М.: Изд-во иностр. лит., 1959. С. 57–76.
57. Sachse H. // Ber. 1890. Bd. 23. S. 1363.
58. Sachse H. // Ztschr. phys. Chem. 1892. Bd. 10. S. 203–241.
59. Mohr E. // J. Prakt. Chem. 1918. Vol. 98. P. 315–353.
60. Mohr E. // Ber. 1922. Bd. 55. S. 230–231.
61. Barton D.H.R. // Experientia. 1950. Vol. 6. P. 316–320.
62. Barton D.H.R., Cookson R.C. // Quart. Rev. Chem. Soc. 1956. Vol. 10. P. 44–82.
63. Барто́н Д.Г.Р. // Теоретическая органическая химия: Докл. представ. на симпоз. памяти Кекуле. М: Изд-во иностр. лит., 1963. С. 160–180.
64. Pullman B., Pullman A. // Adv. Protein Chem. 1974. Vol. 28. P. 348–524.
65. Hill T.L. // J. Chem. Phys. 1946. Vol. 14. P. 465–472.
66. Westheimer F.H., Mayer J.E. // Ibid. P. 733–738.
67. Кутайгородский А.И. // Изв. АН СССР. Сер. физ. 1951. Т. 15. С. 157–168.
68. Кутайгородский А.И. // Докл. АН СССР. 1959. Т. 124. С. 1267–1273.
69. Кутайгородский А.И. // Там же. 1961. Т. 137. С. 116–122.
70. Kitaygorodski A.I. // Tetrahedron. 1960. Vol. 9. P. 183–193.
71. Kitaygorodsi A.I. // Ibid. 1961. Vol. 14. P. 230–236.
72. Илья́ев Э., Аллинжер Н., Энжиал С., Моррисон Г. Конформационный анализ. М.: Мир, 1969.
73. Pitzer K.S. // Adv. Chem. Phys. 1959. Vol. 2. P. 59–102.
74. Уэстгеймер Ф. Пространственные эффекты в органической химии. М.: Изд-во иностр. лит., 1960.
75. Кутайгородский А.И. // Успехи физ. наук. 1979. Т. 127. С. 391–420.
76. Кутайгородский А.И. Молекулярные кристаллы. М.: Наука, 1971.
77. Scheraga H.A. // Adv. Phys. and Org. Chem. 1968. Vol. 6. P. 103–184.
78. Ramachandran G.N., Sasisekharan V. // Advances in protein chemistry. N.Y.; L.: Acad. press, 1968. P. 283–437.
79. Полозов Р.В. Метод полуэмпирического силового поля в конформационном анализе биополимеров. М.: Наука, 1981.
80. Дашевский В.Г. Конформационный анализ органических молекул. М.: Химия, 1982.
81. Hill T.L. // J. Chem. Phys. 1948. Vol. 16. P. 399–405.
82. Kreevoy M.M., Mason E.A. // J. Amer. Chem. Soc. 1957. Vol. 79. P. 4851–4854.
83. Hendrickson J.B. // Ibid. 1961. Vol. 83. P. 4537–4543.
84. Momany F.A., McGuire R.F., Burgess A.W., Scheraga H.A. // J. Phys. Chem. 1975. Vol. 79. P. 2361–2381.
85. Scott R.A., Scheraga H.A. // J. Chem. Phys. 1966. Vol. 45. P. 2091–2101.
86. Brant D.A., Flory P.J. // J. Amer. Chem. Soc. 1966. Vol. 87. P. 2791–2799.
87. De Santis P., Giglio E., Liguori A.M., Ripamonti A. // Nature. 1965. Vol. 206. P. 456–460.
88. Коулсон Ч. Валентность. М.: Мир, 1965.
89. Vixon M., Lifson S. // Tetrahedron. 1967. Vol. 23. P. 769–784.
90. Jeans J.H. Mathematical theory of electricity and magnetism. 5th ed. Cambridge: Univ. press, 1933.
91. Kirkwood J.G., Westheimer F.H. // J. Chem. Phys. 1938. Vol. 6. P. 506–513.
92. Kurland R.J., Wilson E.B. // Ibid. 1957. Vol. 27. P. 585–592.
93. Poland D., Scheraga H.A. // Biochemistry. 1967. Vol. 6. P. 3791–3800.
94. Попов Е.М., Желтова В.Н. // Журн. прикл. спектроскопии. 1971. Т. 14. С. 122–128.
95. Krimm S., Mark J. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1968. Vol. 60. P. 1122–1128.
96. Липкинд Г.М., Архипова С.Ф., Попов Е.М. // Журн. структур. химии. 1970. Т. 11. С. 121–126.
97. Ebert L. // Dipolmoment und chemische Structure. Leipzig: Leipziger Vortrage, 1929. S. 44–47.
98. Eyring H. // J. Amer. Chem. Soc. 1932. Vol. 54. P. 3191–3203.
99. Kempl J.D., Pitzer K.S. // J. Chem. Phys. 1936. Vol. 4. P. 749–752.
100. Kistiakowsky G.B., Lacher J.R., Sniff F. // Ibid. 1938. Vol. 6. P. 407–411.
101. Smith L.G. // Ibid. 1949. Vol. 17. P. 139–167.

102. Мидзусима С. Строение молекул и внутреннее вращение. М.: Изд-во иностр. лит., 1957.
103. Kohlrausch K W. // Ztschr. phys. Chem. 1932. Bd. 18B. S. 61–72.
104. Edgell W.F., Glocker G. // J. Chem. Phys. 1941. Vol. 9. P. 375–376.
105. Rew J.T., Gwinn W.D. // Ibid. 1950. Vol. 18. P. 1642–1652.
106. Herzberg G. Infrared and Raman spectra of polyatomic molecules. N.Y.: Acad. press, 1945.
107. Beach J.Y., Palmer K.J. // J. Chem. Phys. 1938. Vol. 6. P. 639–644.
108. Ainsworth J., Kerle J. // Ibid. 1952. Vol. 20. P. 425–427.
109. Milberg M.E., Lipcomb W.N. // Acta crystallogr. 1951. Vol. 4. P. 369–373.
110. Wilson E.B. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1957. Vol. 43. P. 816–820.
111. Langseth A., Bernstein H.J., Bak B. // J. Chem. Phys. 1940. Vol. 8. P. 415–418.
112. Pauling L. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1958. Vol. 44. P. 211–216.
113. Полинг Л. // Теоретическая органическая химия. И.: Изд-во иностр. лит., 1963. С. 7–16.
114. IUPAC-IUB Joint Commision on biochemical nomenclature // J. Biol. Chem. 1983. Vol. 260. P. 14–42.
115. Pauling L. / Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1928. Vol. 14. P. 359–363.
116. Lennard-Jones J., Pople J.A. // Proc. Roy. Soc. London A. 1951. Vol. 205. P. 155–166.
117. Fyfe W.S. // J. Chem. Phys. 1953. Vol. 21. P. 2–5.
118. Schneider W.G. // Ibid. 1955. Vol. 23. P. 26–31.
119. Murray F.E., Schneider W.G. // Canad. J. Chem. 1955. Vol. 33. P. 797–804.
120. Пиментел Дж., Мак-Клеллан О. Водородная связь. М.: Мир, 1964.
121. Соколов Н.Д. // Докл. АН СССР. 1947. Т. 58. С. 611–617.
122. Соколов Н.Д. // Там же. 1948. Т. 60. С. 825–831.
123. Соколов Н.Д. // Успехи физ. наук. 1955. Т. 57. С. 205–235.
124. Lippincott E.R., Schroeder R. // J. Chem. Phys. 1955. Vol. 23. P. 1131–1137.
125. Schroeder R., Lippincott E.R. // J. Phys. Chem. 1957. Vol. 61. P. 921–926.
126. Moulton W.G., Kromhout R.A. // J. Chem. Phys. 1956. Vol. 24. P. 34–40.
127. Stockmayer W.H. // Ibid. 1941. Vol. 9. P. 398–405.
128. Попов Е.М., Дашевский В.Г., Липкинд Г.М., Архипова С.Ф. // Молекуляр. биология 1968. Т. 2. С. 612–620.
129. Morse P.M. // Phys. Rev. 1929. Vol. 34. P. 57–64.
130. Pauling L. // Symp. on protein structure analysis. L.; N.Y.: Methuen-Wiley, 1957. P. 5–7.

Часть II

ПРОСТЕЙШИЕ ПЕПТИДЫ

В решении проблемы структурной организации белков изучение взаимодействий между валентно-несвязанными атомами в свободных аминокислотных остатках представляет особый интерес. Эти взаимодействия определяют у каждого стандартного остатка его конформационную потенцию, которая при укладке белковой цепи в нативную трехмерную структуру реализуется в виде определенного конформационного состояния. Знание максимальных конформационных возможностей свободного звена полипептидной цепи является исходным в последующем изучении средних и дальних межостаточных невалентных взаимодействий, благодаря чему оно составляет основу метода структурного анализа пептидов и белков.

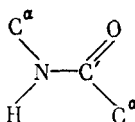
Простейшими молекулами, моделирующими конформационные возможности свободных аминокислотных остатков, являются метиламиды N-ацетил- α -аминокислот, $\text{CH}_3\text{--CONH--C}^\alpha\text{HR--CONH--CH}_3$. В состав таких молекул (назовем их ради краткости монопептидами) входят две пептидные группы, структура которых во многом определяет их свойства, в частности конформационные возможности. Поэтому перед рассмотрением структурной организации монопептидов α -аминокислот целесообразно остановиться на электронных и конформационных особенностях простых органических молекул, содержащих пептидные (амидные) группы.

Глава 4

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПЕПТИДНОЙ ГРУППЫ

Строение и свойства пептидной группы представляют исключительный интерес для молекулярной биологии и теоретической химии. Она является элементарным звеном основной цепи белков, входит в боковые цепи аминокислот Asp и Gln, присутствует в составе большого числа природных соединений. Несомненно, это одна из самых распространенных в природе совокупностей валентно-связанных атомов. Данный факт весьма знаменателен, и, по-видимому, его одного уже достаточно для предположения об исключительной структурной организации пептидной группы, ее универсальности.

Многое о свойствах пептидной группы может сказать ее химическая формула:



Прежде всего она показывает, что группа состоит из двух непосредственно связанных между собой атомных группировок, имеющих диаметрально противоположные склонности к взаимодействию с электроном, — сильного электроноакцептора ($C^{\alpha}CO-$) и сильного электронодонора ($C^{\alpha}HN-$). Такое строение пептидной группы позволяет предположить большие возможности в изменении ее свойств под действием внутримолекулярных и межмолекулярных факторов, влияющих на донорно-акцепторные способности фрагментов. Наиболее чувствительной в этом случае оказывается центральная пептидная связь. Предположение подтверждается качественным рассмотрением электронного строения группы. Она обладает π -электронной системой и подвижными неподеленными парами электронов атомов N и O, а также может образовывать водородные связи, выступая при этом как донор и как акцептор протонов. Атомы пептидной группы имеют существенно разную электроотрицательность и заметно отличаются по величине и знаку парциальных зарядов. Если оставаться в границах понятий и представлений, сложившихся в органической химии, то можно сказать, что строение и свойства этой небольшой совокупности атомов обусловлены действием практически всех известных электронных эффектов: делокализацией π -электронов, индуктивным влиянием, смещением неподеленных пар электронов и изменением гибридизации атомов, гиперконъюгационным эффектом, полярным влиянием, образованием водородных связей, диполь-дипольными и донорно-акцепторными взаимодействиями. В отличие от других классов органических соединений, свойства которых, как правило, находят удовлетворительное объяснение в доминирующем влиянии одного-двух из отмеченных эффектов, в пептидах и амидах все они играют важную роль и находятся в неразрывной взаимосвязи. Само их разделение по отношению к пептидной группе выглядит условным. Она как никакая другая группа представляет собой целостную систему и требует независимого рассмотрения.

Итак, можно заключить, что пептидная группа обладает повышенной восприимчивостью к внешним воздействиям и отличается высокой лабильностью в распределении электронной плотности. Сказанное, однако, не исключает известную химическую стабильность пептидной связи. Ее устойчивость объясняется сохранением при изменении внешних условий, не превышающих определенных границ, согласованности во взаимоотношениях между фрагментами пептидной группы, обладающими противоположными и, следовательно, согласно принципу Н. Бора, дополняющими друг друга электронными свойствами.

В настоящей главе рассматриваются экспериментальные и теоретические исследования пептидной группы и обсуждается существующее представление о ее структурной организации в свете имеющихся опытных

данных, результатов квантовохимических расчетов и теоретического анализа колебательных спектров соответствующих молекул. Ряд соображений общего порядка, высказанных о химическом строении пептидной группы, в той или иной мере справедливы и для сложноэфирной ($-\text{COOR}$) и цианамидной ($>\text{N}-\text{CN}$) групп, в которых также осуществляется прямая связь между электронодонорной и электроноакцепторной группировками атомов. Поэтому представляется целесообразным их совместное с пептидной группой обсуждение и сопоставление некоторых свойств.

4.1. КОНФИГУРАЦИЯ ПЕПТИДНОЙ ГРУППЫ

Простейшей молекулой, включающей пептидную связь, является формамид ($\text{H}_2\text{N}-\text{CHO}$). Первое исследование геометрии этой молекулы в неассоциированном состоянии выполнено Р. Курландом и Э. Вильсоном на основе микроволновых спектров четырех изотопных соединений [1]. При расчете структурных параметров предполагалась плоская молекулярная модель с эквивалентными связями NH . Позднее микроволновые спектры формамида были изучены С. Костейном и Дж. Даулингом, но уже при использовании десяти изотопных соединений [2]. Это позволило полностью априорно, т.е. не делая предположений о геометрии молекулы, рассчитать длины связей и валентные углы. Авторы особо подчеркнули, что наблюдаемые спектры этих соединений могут быть однозначно интерпретированы только в случае неплоского строения формамида. Оказалось, что группа $\text{H}_2\text{N}-\text{C}$ образует невысокую пирамиду, а связи, как и углы HNC , заметно отличаются друг от друга. Тем самым экспериментально было подтверждено предположение М. Дейвиса и Дж. Эванса о неплоской структуре формамида, высказанное в 1952 г. при изучении контуров полос валентных колебаний NH в инфракрасных спектрах поглощения паров [3].

Структурные параметры формамида в кристалле были определены Дж. Ладеллом и Б. Постом [4]. При рентгеноструктурном исследовании выяснилось, что ассоциированные молекулы образуют плоскую цепь и имеют отличающиеся от свободных молекул длины связей и валентные углы. Различия оказались столь существенны, что результаты Ладелла и Поста могли бы быть восприняты ошибочными, если бы аналогичные изменения при переходе от паров к кристаллам не были наблюдаемы также у родственных формамиду соединений – ацетамида и N -метилацетамида (табл. II.1.).

Из приведенных данных следует, что переход от свободных молекул к ассоциированным сопровождается значительным укорочением связи $\text{N}-\text{C}'$, удлинением $\text{C}=\text{O}$ и некоторым уменьшением угла между ними. Кроме того, связи амидного азота у молекулы в парах образуют тупую пирамиду, а в кристалле расположены в одной плоскости. Следовательно, смена фазового состояния затрагивает структуру всей пептидной группы, что свидетельствует о происходящих при этом существенном перераспределении электронной плотности и изменении гибридизации атомов. Прежде всего это касается пептидной и карбонильной связей ($\text{N}-\text{C}'$, $\text{C}'=\text{O}$). Длины же связей $\text{C}^\alpha-\text{N}$ и $\text{C}^\alpha-\text{C}'(\text{O})$ в парах и кристалле остаются

Структурные параметры молекул амидов, метиламина и ацетона

Молекула	Агрегатное состояние	Длина связи, Å		Валентный угол N-C'=O, град	Литературный источник
		N-C'	C'=O		
H ₂ N-CHO	Газообразное	1,38	1,19	124	[2]
	Кристаллическое	1,30	1,26	121	[4]
H ₂ N-COCH ₃	Газообразное	1,36	1,21	125	[5]
	Кристаллическое	1,30	1,28	122	[6]
H ₃ CHN-COCH ₃	Газообразное	1,36	1,21	125	[5]
	Кристаллическое	1,29	1,24	123	[7]
H ₂ N-CH ₃	Газообразное	1,47	—	—	[8]
(H ₃ C) ₂ C=O	"	—	1,21	—	[9]

практически теми же (соответственно 1,47 и 1,53 Å [5–7]). Обращает на себя внимание такой интересный факт: у изолированных молекул длина пептидной связи заметно короче длины ординарной связи N–C в метиламине [8] и длины N–C того же гибридного типа в N-метилметиленимине (1,44 Å [10]), а длина карбонильной связи меньше или совпадает с длиной C=O в ацетоне (табл. II.1).

Аналогичная картина наблюдается у эфиров карбоновых кислот и цианамидов. Исследование микроволновых спектров восьми изотопных молекул метилформиата, выполненное Р. Керлом, показало, что в парах длина связи C=O равна 120 Å, а O–C(O) – 1,33 Å [10] (длина чисто ординарной связи O–C гибридного типа sp^2 – sp^2 составляет 1,37 Å [11]). Заметное укорочение связи N–C имеет место и в молекуле цианамида (1,32 по сравнению с 1,37 Å для ординарной связи N–C типа sp^2 – sp [10]); при этом длина связи C≡N практически совпадает с длиной связи в ацетонитриле (соответственно 1,17 и 1,16 Å). Подобно амидной, цианамидная группа в свободном состоянии молекулы непланарна. Согласно микроволновым спектрам, а также неэмпирическому квантовохимическому расчету Дж. Лэна (1970 г.), выход связи N–C из плоскости H₂N–достигает около 40°.

Таким образом, структурные исследования в парах простейших молекул, содержащих пептидную, сложноэфирную и цианамидную группы, привели, на первый взгляд, к парадоксальным результатам. Длины центральных связей в этих группах у неассоциированных молекул оказались значительно короче длин соответствующих ординарных связей тех же гибридных типов атомов, а длины кратных связей, что удивительно, – такими же, как у простых несопряженных молекул, или даже короче. Иными словами, взаимодействие между донорной и акцепторной группировками сказалось лишь на межатомном расстоянии одной связи [N–C(O), O–C(O), N–CN] и не повлияло (или оказало влияние, противоположное

ожидаемому) на длину смежной кратной связи ($C=O$, $C=N$). Неплоское строение аминной части в свободных молекулах амидов и цианамидов более понятно. Оно, очевидно, связано с неполным вырождением пирамидальной структуры аммиака и простых аминов. Сложноэфирная группа, как показало исследование Керла [10], остается плоской у молекул и в газообразном и кристаллическом состояниях. Различие между амидной и цианамидной группами, с одной стороны, и сложноэфирной, с другой, можно связать с несимметричным расположением по отношению к узловой плоскости взаимодействующих орбиталей неподеленной пары электронов атома N и π -электронов $C=O$ или $C=N$ в первом случае и симметричным расположением орбиталей двух неподеленных пар электронов эфирного атома O и π -электронов $C=O$ во втором.

Ассоциация молекул в кристаллах приводит к плоскому строению всех групп, заметному увеличению длин кратных связей и еще большему укорочению длин центральных связей. Такой высокой чувствительности длин связей к межмолекулярным невалентным взаимодействиям не наблюдается у соединений других классов. Принято считать (в подавляющем большинстве случаев оправдано), что межатомные валентные расстояния являются наиболее консервативными молекулярными параметрами.

Значительное укорочение длин пептидной и сложноэфирной связей по сравнению с чисто ординарными связями того же гибридного типа ставит вопрос о конфигурационной изомерии соответствующих молекул¹. Причина уменьшения межатомных расстояний $N-(O)$ и $O-C(O)$ обусловлена повышением порядка этих связей, возникающим в результате дополнительного взаимодействия неподеленных пар электронов атома (n) N или O с π -электронами $C=O$. Максимального стабилизирующего эффекта и, следовательно, наибольшего π -порядка связи, очевидно, следует ожидать, когда ось орбитали одной пары n -электронов азота, в первом случае, и ось суммарной составляющей орбиталей двух пар n -электронов кислорода, во втором, будут параллельны оси орбиталей π -электронов карбонильной группы. Таким образом, общие соображения приводят к заключению о возможном существовании пептидных и сложноэфирных групп в двух энергетически самых предпочтительных ротамерных формах (рис. II. 1), получивших название "*транс*-" и "*цис*-конфигурации".

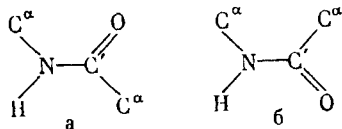


Рис. II.1. Конфигурации пептидной атомной группы

α – *транс*-($\omega = 180^\circ$), β – *цис*-($\omega = 0^\circ$), ω – двугранный угол вращения вокруг связи $N-C$

¹Принятое в литературе понятие "конфигурация" по отношению к пептидной и сложноэфирной группам, строго говоря, не является полностью оправданным, так как переход из одной формы в другую происходит у них без разрыва химических связей. В данном случае этот термин подчеркивает стабильность плоских форм и, следовательно, большую величину разделяющего поворотные изомеры потенциального барьера.

Пептидные и сложноэфирные группы в плоской или почти плоской *цис*-конфигурации ($\omega = 0^\circ$) обычно реализуются в небольших циклических системах. Только такая изомерная форма возможна у обеих групп в шестичленных циклах 2,5-дикетопиперазина, 2,5-дикетоморфолина и их 3,6-производных; она обнаружена во всех лактамах $(\text{CH}_2)_{n-2}\text{CONH}$ и лактонах $(\text{CH}_2)_{n-2}\text{COO}$ размером цикла $n \leq 8$. При увеличении числа звеньев в лактамных и лактонных кольцах пептидная и сложноэфирная группы приобретают плоскую или близкую к плоской *транс*-конфигурацию ($\omega \approx 180^\circ$). Циклический тетрапептид саркозин имеет две амидные группы в *цис*- и две в *транс*-форме. В циклогексапептиде $\text{Gly-Gly-D-Ala-D-Ala-Gly-Gly}$ четыре группы реализуются в *цис*- и две – в *транс*-конфигурации. В циклотетрадепептидах (например, $(\text{Gly-Glyco})_2$, $(\text{MeAla-Lac})_2$ с DDDD-, DDDL-, DLLD-, LDLD- и LDDD-конфигурациями атомов C^α , *D*-Hylv-*L*-Melle-*D*-Hylv-*L*-MeLeu) обе сложноэфирные группы находятся в *транс*-, а промежуточные пептидные – в *цис*-форме; депептидные циклы больших размеров (энниатины, валиномицин и др.) содержат все группы только в *транс*-конфигурации.

Ациклические амиды, как правило, имеют *транс*-формы. Она наблюдается у карбоксильной и сложноэфирной групп в молекулах простых кислот и эфиров. Доминирует эта форма и в составе сложных соединений с открытыми цепями; пептидные группы только в *транс*-конфигурации обнаружены практически у всех исследованных аминокислотных последовательностей линейных полипептидов и белков. Нередко, однако, встречаются случаи, когда ациклические простейшие амиды и пептиды реализуются в двух формах – *цис*- и *транс*- или даже только в *цис*-форме. Положение конфигурационного равновесия зависит от заместителей при атоме N, их объема и строения, а также от природы растворителя. У монозамещенных N-алкилформамидов содержание *цис*-конфигурации растет симбатно с увеличением объема N-заместителя. Так, у N-метилформамида в растворе бензола *цис*-изомер составляет около 8%, N-этил- – 12% и N-*трет*-бутилформамида – 18%, что объясняется невалентными взаимодействиями алкильного радикала с атомом кислорода. С этой же причиной связывают повышение содержания *цис*-формы у N-*трет*-бутилформамида до 63% в растворе серной кислоты, поскольку происходящая в этой среде протонизация карбонильного углерода увеличивает его эффективный радиус. С действием стерического эффекта согласуется и резкое возрастание (по сравнению с N-алкилформамидами) содержания *цис*-конфигурации у соответствующих тиоаналогов.

Взаимодействия валентно-несвязанных атомов, возможно, являются причиной смещения конфигурационного равновесия. Тем не менее, только этим фактором нельзя объяснить экспериментальные данные. Более того, имеющийся материал свидетельствует о том, что стерический эффект не оказывает решающего влияния на содержание *транс*- и *цис*-изомеров

В противном случае трудно было бы, например, понять безусловное пре-валирование *транс*-конфигурации у тех же N-алкилформамидов, в молекулах которых стерические взаимодействия более благоприятствуют *цис*-форме. N-Алкилацетамиды реализуются, как правило, в *транс*-конфигурации. В полярных и неполярных средах только в этой форме обнаружены N-метил-, N-этил-, N-пропил- и N-*трет*-бутилацетамиды. Однако доля *цис*-формы значительно возрастает у фенилацетамидов. Так, у N-*трет*-бутилфенилацетамида в CCl_4 содержание *цис*-конфигурации составляет 70%, у N-*n*-толилфенилацетамида – 90%; исключительно в *цис*-форме находится в этих условиях N-*о*-толилфенилацетамид. Замещение N-алкильного радикала в ацетамидах на ароматическую группу также смещает равновесие в сторону *цис*-изомера. Содержание ацетанилида в *цис*-конфигурации изменяется в растворе хлороформа с 45 до 73% при увеличении концентрации от 1,5 до 52 мол. %. Рост *цис*-изомера скорее всего связан не с изменением константы равновесия *транс*-, *цис*-мономеров в пользу последнего (что маловероятно и, кроме того, противоречит данным ИК-спектров), а с образованием ассоциатов, среди которых преобладают кольцевые димеры *цис*-формы с двумя водородными связями.

Положение конфигурационного равновесия очень подвижно у соединений с несимметричной аминной группой. Наиболее стабильным изомером в амидах типа $\text{R}^1\text{R}^2\text{N}-\text{COR}$ оказывается тот, в котором возникают меньшие силы отталкивания между R при карбониле и одним из заместителей при атоме N. Вопрос о *транс*- и *цис*-изомерии особый интерес представляет для N-метилованных пептидов и пептидных групп, азот которых принадлежит аминокислотному остатку Rго. Группа $-(\text{H}_3\text{C})\text{N}-\text{CO}$ – входит в основную цепь многих биологически активных соединений (деструктин, споридесмолиды, актиномицин, энниатины и др.). Метилирование пептидной группы с точки зрения невалентных взаимодействий должно приводить к уменьшению энергетической разницы между *цис*- и *транс*-состояниями. Действительно, реализация метиламидов N-ацетил-N-метил- α -аминокислот с *цис*-конфигурацией группы $-(\text{H}_3\text{C})\text{N}-\text{CO}$ – обнаруживается по спектрам ЯМР [9]. Теоретический конформационный анализ молекулы метиламида N-ацетил-N-метил-L-аланина с *транс*- и *цис*-конфигурацией третичной аминной группы показал, что энергия наиболее выгодных конфигураций с *цис*-формой лишь на 0,6–0,7 ккал/моль превышает энергию самой предпочтительной конформации с *транс*-формой, что хорошо согласуется с экспериментом [12]. Соответствующее энтальпийное различие у метиламида N-ацетил-L-пролина не превышает 0,5 ккал/моль, а у диметиламида N-ацетил-L-пролина оно близко к нулю [13].

На формирование пространственного строения полипептидов оказывают влияние не только различие в энергии конфигураций отдельных звеньев цепи (хотя это важно), но и кооперативные эффекты. Поэтому в принципе не исключены ситуации, когда даже небольшой предпочтительности в энергии одной из форм окажется достаточно для ее реализации по всей длине полипептидной цепи. Или, напротив, по общей энергии полипептида может стать оптимальной конфигурация пептидной группы,

имеющая несколько большую (в изолированном состоянии) величину энтальпии. Например, поли-*L*-пролин в неполярных средах содержит пептидные группы в *цис*-форме (полипролин I), а в полярных – в *транс*-форме (полипролин II); пептидные группы у его близкого конформационного аналога – поли-*N*-метил-*L*-аланина – в тех же условиях реализуются в *транс*-форме. Согласно результатам теоретического анализа разность в энергии *цис*- и *транс*-полипролина невелика (0–1,4 ккал/моль в пользу последнего) и может перекрываться влиянием растворителя. То обстоятельство, что в белках и линейных природных пептидах реализуется почти исключительно *транс*-конфигурация пептидной группы, лишний раз подтверждает справедливость положения о согласованности (гармонии) всех видов внутримолекулярных невалентных взаимодействий атомов, исходя из принципов теории структурной организации белковых молекул [14].

М. Левитт и С. Лифсон [15], а также Дж. Дайзенхофер и У. Стейгеманн [16] проанализировали данные рентгеноструктурного анализа белков и пришли к выводу о не вполне плоском строении пептидных групп, заключающемся в отклонении двугранного угла ω от 180° , пирамидализации связей атома N и, в меньшей степени, связей карбонильного углерода. Учитывая, однако, разрешающую способность метода, речь не может идти о твердо установленных фактах, а лишь о возможных отклонениях от плоского строения группы и соответствующих инверсиях конфигураций. Теоретические расчеты энергии неплюских деформаций пептидной группы [17] показывают, что поворот вокруг связи N–C' вблизи $\omega = 180^\circ$ на $\pm 10^\circ$ и выход связи N–C из плоскости CNC $^\alpha$ на 20° увеличивают энергию на 2,0–3,0 ккал/моль. Более значительными энергетическими потерями сопровождается пирамидализация связей карбонильного углерода; выход этого атома из плоскости C $^\alpha$ ON на 0,1 Å требует затраты энергии около 5,0 ккал/моль.

Таким образом, опытные данные и результаты теоретического конформационного анализа показывают, что в отношении своей конфигурации пептидная группа в амидах, циклических и линейных пептидах, депсипептидах и белках имеет лишь две вакансии – $\omega = 180^\circ$ и $\omega = 0^\circ$, что, в свою очередь, бесспорно свидетельствует о большой высоте потенциального барьера, разделяющего *транс*- и *цис*-конфигурации.

Имеющиеся в литературе экспериментальные данные об активационных параметрах *транс*–*цис*-перехода (изменения свободной энергии ΔG_{180-90° или близкие им величины изменений энтальпии ΔH_{180-90°) и разностях энтальпии *транс*- и *цис*-конфигурации (ΔH_{180-0°) получены при температурных исследованиях спектров ЯМР, колебательных и микроволновых спектров, а также ультразвуковым методом около 20 простых амидов. Найденные для них барьеры вращения вокруг связи N–C (ΔH_{180-90°) попадают в интервал 14,0–23,0 ккал/моль; приблизительно на порядок меньшие значения имеют параметры ΔH_{180-0° (1,0–3,0 ккал/моль). По ряду причин (использование различных методов и методик, неодинаковые условия проведения эксперимента, разные способы обработки опытных данных) представляется затруднительным четкое выявление тенденции в изменениях величин ΔH_{180-90° и ΔH_{180-0° в зависимости от природы

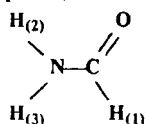
Валентные углы (град) *транс*- и *цис*-конфигураций N-метилацетамида и метилацетата

Валентный угол	Эксперимент [7]; <i>транс</i> -	Расчет [19, 20]		Валентный угол	Экспери- мент [18, 21]; <i>транс</i> -	Расчет [19]	
		<i>транс</i> -	<i>цис</i>			<i>транс</i> -	<i>цис</i> -
N-Метилацетамид							
C ₍₁₎ NC'	121	123	125	C ₍₁₎ O' C'	114	114	116
HNC'		120	120	O' C' O	125	123	118
NC' O	123	122	121	O' C' C ₍₂₎	116	117	123
NC'C ₍₁₎	117	119	121	OC'C ₍₂₎	120	120	119
HC ₍₁₎ H		108	108	HC ₍₁₎ H	108	108	108
HC ₍₂₎ H		108	108	HC ₍₂₎ H	108	108	108
Метилацетат							

заместителей, полярности среды, концентрации и т.д. Учитывая исключительную лабильность строения пептидной группы и многочисленность факторов, которые могут оказывать влияние на величину барьера и разность конфигурационной энтальпии (теплового эффекта перехода *транс* $\rightleftharpoons$ *цис*), по-видимому, бесперспективно пытаться интерпретировать на чисто эмпирической основе наблюдающиеся различия в величинах ΔH . Не позволяет это сделать пока и уровень квантовохимических исследований энергии резонанса амидной связи, которые в зависимости от используемого метода дают большой разброс значений. Теоретический расчет методами ЕНТ, CNDO/2, PCIO, INDO и ab initio приводит к величинам ΔH_{180-90° от 13,0 до 26,0 ккал/моль и ΔH_{180-0° от 0,1 до 7,0 ккал/моль. Аналогичный экспериментальный и теоретический материал по сложноэфирной группе более ограничен. Изменение энтальпии при повороте на 90° вокруг связи O—O (ΔH_{180-90°) у молекул алкилформиатов оценивается в 6,0–9,0 ккал/моль, а на 180° (ΔH_{180-0°) – в 2,0–3,0 ккал/моль [18].

Главная роль, определяющая стабильность *транс*- и *цис*-конфигураций пептидной и сложноэфирной групп, отводится, как правило, стерическому фактору. Для решения вопроса о том, в какой степени предпочтительность той или иной формы обусловлена невалентными взаимодействиями, нами был выполнен расчет двух конформаций N-метилацетамида и метилацетата [19, 20]. Знание геометрических и термодинамических параметров обеих форм простейших молекул полезно при исследовании сложных пептидов и депсипептидов для оценки влияния соседних групп, боковых цепей, водородных связей, включения в цикл и т.д. В рассмотренных молекулах параметры *транс*- и *цис*-конфигураций отвечают пептидной и сложноэфирной группам, не усложненным эффектом дальних взаимодействий. Результаты расчета вместе с экспериментальными данными представлены в табл. II.2.

Для *транс*-форм обеих молекул вычисленные геометрические пара-

Парциальные заряды (ед. e) атомов формамида

Атом	Литературный источник					
	[1]	[22]	[23]	[24, 25]		
				Формамид	Ацетон	Метиламин
O	-0,403	-0,429	-0,422	-0,473	-0,316	-
C	+0,389	+0,295	+0,318	+0,247	+0,132	-
H ₍₁₎	+0,076	+0,134	-	+0,038	-	-
N	-0,608	-0,745	-0,202	-0,063	-	-0,688
H ₍₂₎	+0,273	+0,362	-	+0,084	-	+0,237
H ₍₃₎	+0,273	+0,382	+0,204	+0,167	-	+0,237

метры удовлетворительно совпадают с опытными значениями. Переход одной формы в другую, как показал расчет, сопровождается изменениями валентных углов, причем особенно большие различия в двух конфигурациях имеют углы при карбонильном углероде метилацетата. По невалентным взаимодействиям предпочтительной в обоих случаях оказывается *транс*-конфигурация; у N-метилацетамида ΔH_{180-0° составляет 0,9, а у метилацетата – 0,7 ккал/моль, что заметно меньше опытных значений. Следовательно, более низкую энергию *транс*-конфигураций у рассмотренных молекул нельзя объяснить только стерическим эффектом.

Вклады в энергию конфигураций пептидной и сложнэфирной групп вносят электростатические взаимодействия атомов. В табл. II.3 приведены парциальные заряды атомов формамида, найденные при использовании различных методов.

Впервые заряды на атомах формамида были определены Курландом и Вильсоном [1]. В своих расчетах авторы использовали проекции дипольного момента на три главные оси инерции, известные из измерений эффекта Штарка, данные собственных исследований микроволновых спектров и дипольные моменты связей, найденные в других молекулах. Таким образом, рассчитанные заряды являются результатом аддитивного подхода, вряд ли оправданным в данном случае. Г. Баш, М. Робин и Н. Кузблер нашли эффективные заряды на атомах формамида, рассмотрев основное и возбужденное состояния молекулы методом LCAO-SCF с учетом σ - и π -электронов [22]. Согласно полученным данным, дипольный момент связи N–H равен 1,8 D. Р. Курланд и Э. Вильсон определили его в 1,3 D, что равно значениям момента в аммиаке и метиламине. Такое высокое значение μ_{NH} в формамиде маловероятно. Как установил Ч. Коулсон, дипольный момент аммиака возникает главным образом вследствие неподеленной пары электронов атома N, а не благодаря собственным

моментам связей NH [26]. Поскольку в формамиде неподеленная пара электронов атома N смещена в сторону карбонила, следует ожидать уменьшения значения μ_{NH} . Дипольный момент всей молекулы, рассчитанный в работе [22], составляет 4,95 D, что заметно выше экспериментального значения 3,71 D [1].

Д. Поланд и Г. Шерага нашли заряды на атомах пептидной группы, включенной в полимерную цепь [23]. Каждый заряд был представлен инвариантной суммой σ - и π -зарядов; распределение σ -электронов рассчитано методом LCAO-MO, модифицированным Дель-Ре, а π -заряды атомов O, C и N найдены эмпирически, используя соотношение между компонентами дипольного момента μ_x, μ_y , зарядами q_O, q_C, q_N и уравнение $\sum q_i = 0$.

Дипольный момент пептидной группы и его направление были взяты такими же, как у формамида, т.е. 3,71 D и $39,6^\circ$ [1]. Такой подход не свободен от возражений. Как видно из анализа длин связей, распределение электронной плотности в каждой связи формамида существенно отличается у свободной молекулы от распределения у ассоциированной молекулы. Поэтому трудно ожидать равенства как по величине, так и по направлению дипольных моментов пептидной группы и формамида.

В работе [24] заряды на атомах формамида были определены с помощью теоретического анализа интенсивностей ИК-полос поглощения молекул H_2N-CHO и D_2N-CHO в газовой фазе. Как и в упомянутых выше исследованиях, заряды на атомах рассчитывались в монополярном приближении, но в отличие от прежних расчетов не были привлечены данные по другим соединениям. Аналогичным способом, также полностью независимо, были рассчитаны для сравнения электрооптические параметры (μ и $d\mu/dq$) ацетона и метиламина [25]. Приведенные в табл. II.3 данные ниже рассматриваются в свете существующих представлений о структурной организации формамида. Сейчас же оценим их с точки зрения обсуждаемого вопроса о роли электростатических взаимодействий в стабилизации *транс*- и *цис*-конфигураций пептидной группы. Хотя найденные величины парциальных зарядов на атомах, как видно из табл. II.3, зависят от метода расчета, тем не менее полученные во всех работах общие характеристики распределения электронной плотности качественно совпадают.

В N-метилацетамиде электростатические взаимодействия (главным образом притяжение атомов H и O в связях N-H и C-O) вносят стабилизирующий вклад в энергию *цис*-формы ($\sim 0,4$ ккал/моль). В метилацетате эффект противоположный – взаимодействия зарядов стабилизируют *транс*-форму ($\sim 0,8$ ккал/моль). Таким образом, наблюдающиеся различия в энергии *транс*- и *цис*-конфигураций N-метилацетамида и метилацетата не могут быть объяснены суммарным эффектом невалентных ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий. Неизбежно предположение о различии (незначительном в масштабе энергии связи, но существенном для установления той или иной пространственной формы) в электронном строении двух конфигураций. По приближенной оценке величина валентного вклада в стабилизацию *транс*-формы алкиламидов составляет 1,0–2,0 ккал/моль.

Отклонение от аддитивности в распределении электронной плотности на связях объясняет доминирование у N-алкилформамидов *транс*-конфигурации, уступающей альтернативной форме по невалентным взаимодействиям. Правда, стерическая предпочтительность *цис*-конфигурации здесь невелика, поскольку контактный ван-дер-ваальсовый радиус атома O (1,5 Å) лишь немного больше радиуса атома H (1,2 Å). У ацетамидов ситуация меняется на противоположную – эффективный радиус метильной группы (1,8–2,0 Å) превышает радиус кислорода. Поэтому *транс*-конфигурация N-алкилацетамидов дополнительно (но не главным образом) стабилизируется ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями. По аналогии с рядом других органических молекул можно предположить, что преимущество *транс*-формы N-метилацетамида связано с более полным проявлением гиперконъюгационного эффекта из-за большей сближенности метильной группы с π -электронной системой карбонила. На небольшое различие в электронных свойствах связей в *транс*- и *цис*-конфигурациях указывают некоторые опытные факты. Так, исследование Костейна и Даулинга пространственной структуры формамида свидетельствует о неполной эквивалентности связей N–H аминогруппы [2], что уже отмечалось. Этот вывод подкрепляется также результатами теоретического анализа интенсивностей полос поглощения в ИК-спектрах паров формамида, расчет показал, что дипольные моменты *транс*- и *цис*-связей N–H неодинаковы и равны соответственно 0,8 и 0,4 D [24]. Далее, вторичные амиды со значительным содержанием в разбавленном растворе обеих форм имеют в ИК-спектрах две полосы поглощения валентного колебания NH. Одна из них ($\nu \sim 3460 \text{ см}^{-1}$) относится к *транс*-форме молекулы, а другая ($\nu \sim 3400 \text{ см}^{-1}$) – к *цис*-форме. Поскольку характер колебания N–H в двух конфигурациях практически одинаков, заметное различие частот ν_{NH} связано с разными значениями силовой постоянной K_{NH} , а следовательно, и с отличающимся электронным строением связей NH в *транс*- и *цис*-положении.

4.2. КОЛЕБАТЕЛЬНЫЕ СПЕКТРЫ АМИДОВ

Как уже упоминалось, пептидная группа имеет лабильное электронное строение. В предыдущем разделе рассмотрено проявление этого свойства в геометрии группы – длинах химических связей, валентных углах и конфигурации. Не менее показательным здесь являются и колебательные спектры, в частности инфракрасные спектры поглощения, частоты которых отражают механические характеристики молекул, а интенсивности полос – дипольные моменты связей и их чувствительность к естественным колебательным координатам ($\partial\mu/\partial q$; $\partial\mu/\partial\alpha$; где q и α , соответственно отклонения длин связей и валентных углов от равновесных значений). И то и другое, помимо кинематики, определяется динамикой колебания, непосредственно связанной с электронным строением – поляризациями связей и миграцией зарядов в процессе нормальных колебаний молекул. В силу этого в колебательных спектрах заключена богатейшая информа-

Частоты колебаний амидной группы N-метилацетамида

Частота, см ⁻¹	Агрегатное состояние					Δν _{макс}
	Газ	Раствор CCl ₄ ($< 0,005$ М/л)	Жид- кость	Кристалл		
				-10°C	-100°C	
ν _{NH}	3494	3476	3294	3270	3250	-244
ν _I	1722	1700	1653	1653	1645	-77
ν _{II}	1497	1500	1565	1564	1584	+87
ν _{III}	1257	1260	1299	1300	1314	+57
ν _V	620	648	725	760	787	+167
ν _{VI}	560	585	600	606	615	+55

ция о внутреннем устройстве молекул и ее составляющих, а также межмолекулярных взаимодействиях.

На исключительность структурной организации пептидной группы указывает уже простое сопоставление наблюдаемых частот и интенсивностей ИК-спектров. В табл. II.4 приведены частоты так называемых амидных полос поглощения N-метилацетамида (ν_{NH} , $\nu_{\text{I}}-\nu_{\text{VI}}$) в ИК-спектрах в газовой фазе, растворе CCl_4 и двух кристаллических модификациях.

Данные таблицы показывают, что переход от одного предельного состояния N-метилацетамида (отсутствие каких-либо ассоциаций) к другому предельному состоянию (максимальные межмолекулярные взаимодействия) сопровождается беспрецедентно значительными изменениями всех амидных частот, что в свою очередь свидетельствует о существенном перераспределении электронной плотности во всех связях молекулы, а не только в тех, которые непосредственно участвуют в образовании водородного связывания.

Структура пептидной группы чувствительна к внутримолекулярному окружению. В табл. II.5 сопоставлены частоты валентных колебаний $\text{C}=\text{O}$ в спектрах паров формамида, ацетамида и их N-метилпроизводных. Значительные смещения частот вызваны различиями в электронных эффектах атома Н и группы CH_3 , очень слабых, если ориентироваться по другим молекулам. Например, подобные замещения в альдегидах и кетонах изменяют те же частоты $\nu(\text{C}=\text{O})$ всего лишь на несколько см^{-1} .

О повышенной лабильности электронного строения пептидной группы свидетельствуют также необычно высокие значения интегральных интенсивностей ее полос поглощения, определяемых главным образом производными $d\mu/dq$. Сравним несколько значений интенсивностей колебаний формамида со значениями интенсивностей тех же по форме колебаний в других молекулах. Так, интенсивности полос симметричных и антисимметричных колебаний NH_2 в метиламиде (3360 и 3423 см^{-1}) составляют $0,003$ и $0,003 (\text{D}/\text{\AA})^2$, а в формамиде (3445 и 3545 см^{-1}) – $1,04$ и $1,12 (\text{D}/\text{\AA})^2$.

Частоты колебаний C=O в N-метилпроизводных формамида и ацетамида

Соединение	Частота, см ⁻¹	Соединение	Частота, см ⁻¹
H ₂ N-CHO	1755	H ₂ N-COCH ₃	1733
CH ₃ NN-CHO	1733	CH ₃ NN-COCH ₃	1722
(CH ₃) ₂ N-CHO	1714	(CH ₃) ₂ N-COCH ₃	1695

Интенсивность полосы валентного колебания C=O в ацетоне равна 4,95 (D/Å)², а в формамиде – 13,69 (D/Å)² [24–26].

Для получения более полного и строгого представления о структурной организации пептидной группы из колебательных спектров необходим их теоретический анализ, т.е. переход от наблюдаемых частот и интенсивностей полос поглощения к значениям силовых постоянных и электрооптических параметров с последующим сопоставлением с соответствующими характеристиками атомных групп в других молекулах.

Рассмотрим сначала особенности силового поля пептидной группы. Для его определения нами были рассчитаны колебательные спектры свободных молекул формамида и всех его метильных производных, включая их *D*-изотопозамещенные: ацетамида, N-метилформамида, N-метилацетамида, N-диметилформамида и N-диметилацетамида [27]. Простейшие амиды содержат структурные элементы, упругие свойства которых были детально изучены нами ранее на более простых молекулах. Так, в расчетах первичных, вторичных и третичных метиламинов [28] и N-метилметиленимина [29] определены силовые постоянные метильной группы при азоте, постоянные σ -связей N–C разных гибридных типов и постоянная π -связи N=C. Таким образом, до расчета колебательных спектров амидов был известен интервал возможных изменений силовой постоянной связи N–C при вариации ее π -порядка от 0 до 1. Полученные данные также показали малое влияние гибридизации атома N и порядка смежной связи на силовое поле группы N–CH₃. В предварительно выполненных расчетах колебательных спектров альдегидов и кетонов [30, 31] были найдены силовые постоянные метильной группы при карбониле, постоянные (O)C–CH₃ и C=O. Обнаружено, что метилирование карбонильной группы вызывает заметное ослабление ее упругих свойств.

Таким образом, данные по модельным соединениям позволили еще до расчета колебательных спектров амидов сделать ряд допущений, касающихся силовых постоянных метильных групп и характера их влияния на механические свойства пептидной группы, которые в процессе расчета подвергались проверке. Исследование простых молекул привело к количественным оценкам характеристичности многих колебаний по частоте и форме, что представляет интерес для строгой интерпретации спектров амидов. Совпадение опытных и рассчитанных частот вполне характеристичных для отдельных атомных групп колебаний является критерием правильности исходных предположений о перенесении соответствующих силовых постоянных из одних молекул в другие.

Расчет подтвердил возможность использования многих силовых постоянных модельных соединений. Следовательно, решение обратной спектральной задачи для амидов свелось, по существу, к нахождению силового поля самой пептидной группы. Выбор для этой цели всех метильных производных формамида, как и их дейтерозамещенных, способствовал более надежному решению задачи. Дело в том, что замена атомов Н на CH_3 , как и на D, приводит к существенному изменению частот и форм колебаний, в которых координаты пептидной группы принимают большое участие. Характер же влияния таких замен на силовое поле группы известен из расчета соответствующих модельных соединений. О справедливости отмеченных допущений свидетельствует совпадение всех (около 160) рассчитанных и наблюдаемых колебательных частот спектров формамида, ацетамида, их N-метильных производных и дейтерозамещенных [27].

Теоретический анализ колебательных спектров показал, что силовое поле пептидной группы не остается постоянным при замене атомов Н на метильные группы. Метилирование амидов приводит к уменьшению силовой постоянной карбонильной группы и увеличению постоянной связи $\text{N}-\text{C}(\text{O})$. Несмотря на некоторые различия, силовые поля всех рассмотренных амидов близки. Они имеют ряд особенностей, характерных также для силовых полей эфиров карбоновых кислот и цианамидов. Наличие общих, специфических соотношений между силовыми постоянными позволило выделить силовые поля этих молекул в особый тип, названный донорно-акцепторным [32, 33]. Расчеты спектров амидов [27, 28], эфиров карбоновых кислот [34] и цианамидов [33] показали, что донорно-акцепторное взаимодействие приводит к существенному увеличению силовой постоянной промежуточной связи и появлению очень большой по величине постоянной взаимодействия такой связи с акцепторной группой. При этом силовая постоянная самой акцепторной группы изменяется мало; она может быть как несколько больше, так и немного меньше силовой постоянной невозмущенной группы в модельном соединении. Так, в неассоциированных молекулах амидов силовая постоянная $\text{NC}(\text{O})$ имеет величину $\sim 13,0$ (постоянная ординарной связи $\text{N}-\text{C}$ равна 8,3 [27, 28], а двойной связи $\text{N}=\text{C}$ — 16,0 [28]); постоянная взаимодействия $\text{N}-\text{C}(\text{O})$ с $\text{C}=\text{O}$ равна $\sim 2,0 \cdot 10^{-6} \text{ см}^{-2}$, т.е. составляет более 15% (для сравнения, постоянная взаимодействия связей в группе $\text{C}=\text{N}=\text{C}$ у N-метилметиленимина равна $0,2 \cdot 10^{-6} \text{ см}^{-2}$ [28]); силовая постоянная $\text{C}=\text{O}$ находится в интервале 19,0–17,6 (постоянная $\text{C}=\text{O}$ в ацетоне равна $18,0 \cdot 10^{-6} \text{ см}^{-2}$ [31]). В то же время силовые поля атомных групп $(\text{C})\text{N}-\text{CH}_3$ и $(\text{O})\text{C}-\text{CH}_3$ не претерпевают заметных изменений и остаются почти такими же, как соответственно в N-метилметиленимине [27, 29] и ацетоне [27, 31].

Расчеты колебательных спектров молекул эфиров карбоновых кислот [34] и цианамидов [32] свидетельствуют, что и здесь имеет место существенное увеличение силовой постоянной промежуточной связи ($\text{O}-\text{C}(\text{O})$ и $\text{N}-\text{CN}$) и появление очень большой по величине постоянной взаимодействия этой связи с акцепторной группой ($\text{C}=\text{O}$ и $\text{C}=\text{N}$). Качественное отличие силового поля донорно-акцепторного типа от полей других типов [35], очевидно, объясняется особым характером электронного строения

Электрооптические параметры формамида, ацетона и метиламина

Группа	Параметр	Значение параметра (D, D/Å)		
		H ₂ N-CHO	(H ₃ C) ₂ CO	H ₂ N-CH ₃
C=O	μ_{CO}	2,70	1,84	—
	$\partial\mu_{\text{CO}}/\partial q_{\text{CO}}$	8,05	5,21	—
N-C'	$\mu_{\text{NC}'}$	0,9	—	-0,3
	$\partial\mu_{\text{NC}'}/\partial q_{\text{NC}'}$	1,86	—	-0,72
NH ₂	$\mu_{\text{NH}_{(1)}}$	0,40	—	1,15
	$\mu_{\text{NH}_{(2)}}$	0,80	—	1,15
	$\partial\mu_{\text{NH}_{(1)}}/\partial q_{\text{NH}_{(1)}}$	1,18	—	0,04
	$\partial\mu_{\text{NH}_{(2)}}/\partial q_{\text{NH}_{(2)}}$	0,29	—	0,04

пептидной, сложноэфирной и цианамидной групп. Соотношение между силовыми постоянными этих групп и распределением электронной плотности обсуждается в следующем разделе. А сейчас рассмотрим электрическое поле формамида и сравним его с полями метиламина и ацетона. Электрическое поле молекулы характеризуется совокупностью электрооптических параметров – дипольных моментов связей и производными от них по колебательным координатам, значения которых находятся из экспериментально наблюдаемых интенсивностей ИК-полос поглощения. Некоторые из электрооптических параметров молекул формамида, ацетона и метиламина, найденных на основе абсолютных интегральных интенсивностей основных полос поглощения паров, приведены в табл. II.6. В ней сопоставлены дипольные моменты C=O, N-C и N-H и их производных по растяжению связей трех молекул [24, 25].

Электрооптические параметры формамида, как видно из табл. II.6, существенно отличаются от параметров аналогичных структурных элементов ацетона и метиламина. Это указывает на то, что при непосредственном связывании аминогруппы с карбонилем происходит значительное перераспределение электронной плотности. Оно приводит к увеличению дипольного момента C=O, изменению величины и знака момента N-C и уменьшению и дифференциации дипольных моментов двух связей N-H аминогруппы. Одновременно резко увеличиваются величины производных дипольных моментов всех связей по их растяжению, что свидетельствует о возросшей способности к миграции заряда в процессе колебаний, вызванной делокализацией электронной плотности. На значительное взаимодействие связей в формамиде указывают также большие величины производных дипольных моментов одних связей по растяжению других ($\partial\mu_{\text{CO}}/\partial q_{\text{CN}}$, $\partial\mu_{\text{CN}}/\partial q_{\text{CO}}$ и т.д.) [24].

Изменение (по сравнению с метиламином) направления дипольного момента N-C в формамиде может быть вызвано двумя причинами. Первая связана с разной гибридизацией атомов углерода в этих молекулах. В метиламине атом C находится в состоянии, близком к sp^3 -гибридизации, в формамиде $-sp^2$. Углерод в sp^2 -гибридизации, как известно, является

более электроотрицательным, чем в sp^3 -гибридизации [36]. Вторая причина связана с донорно-акцепторным взаимодействием групп H_2N и $C=O$. Частичное смещение неподеленной пары электронов атома N в сторону карбонильной группы приводит к уменьшению эффективного отрицательного заряда на азоте и одновременно к увеличению его на углероде. Понижение электроотрицательности атома N, в свою очередь, вызывает уменьшение дипольных моментов N-H аминогруппы. Разные величины дипольных моментов связи N-H свидетельствуют об асимметрии в распределении электронной плотности в группе NH_2 . Наибольшее отклонение наблюдается у связи N-H, находящейся в *цис*-положении по отношению к $C=O$.

4.3. ЭЛЕКТРОННАЯ СТРУКТУРА ПЕПТИДНОЙ ГРУППЫ

В предыдущем разделе обсуждались пространственное строение и колебательные спектры пептидной группы и родственных ей сложноэфирной и цианамидной. В табл. II.7 длины связей и силовые постоянные этих групп сопоставлены с аналогичными параметрами ряда простейших молекул, содержащих те же связи. Приведенные данные получены при изучении соединений в газообразном состоянии. Следовательно, они характеризуют геометрию и механические свойства связей и атомных групп, не возмущенных межмолекулярными взаимодействиями, в частности водородными связями. Уже отмечалось, что при переходе от газообразного состояния амидов к кристаллическому имеют место существенные изменения длин связей и колебательных частот пептидной группы, свидетельствующие о значительном перераспределении электронной плотности (см. табл. II.1 и II.4). Автором [37] был рассчитан колебательный спектр N-метилацетамида в кристалле, используя структурные параметры Дж. Катци и Б. Поста [7] и частоты инфракрасных спектров $H_3CHN-COCH_3$ и $H_3CDN-COCH_3$ полученные Е. Брэдбери и А. Эллиотом [38] и Дж. Джакешем и Б. Шейдером [39]. В расчет включены две водородные связи, которые образует каждая молекула амида в плоской полимерной цепочке. В результате получены следующие силовые постоянные пептидной группы (в скобках приведены значения, отвечающие газовому состоянию): $K_{NC'} = 14,5$ (13,0), $K_{CO} = 16,1$ (17,8), $H^{CONC'} = 3,0$ (2,2), $K_{NH} = 10,4$ (11,4), силовая постоянная водородной связи $NH...OC' - 0,2 \cdot 10^{-6} \text{ см}^{-2}$.

Важное значение имеет то обстоятельство, что большие изменения частот нормальных колебаний и интенсивностей полос поглощения пептидной группы, которые наблюдаются в спектрах при переходе N-метилацетамида от свободного состояния молекулы к ассоциированному посредством двух водородных связей, не сопровождаются изменениями частот и интенсивностей характеристических колебаний атомных групп $(C)N-CH_3$ и $(O)C-CH_3$. Перераспределение электронной плотности при взаимодействии молекул происходит исключительно в пределах пептидной группы $-HN-CO-$ и не затрагивает метильные группы и примыкающие к ним связи. Поэтому можно заключить, что в основных цепях аминокислотных после-

Длины связей и силовые постоянные связей N-C' и C=O

Молекула	Группа	Длина, Å		Силовая постоянная, 10^{-6} см^{-2}		
		L_1	L_2	K_1	K_2	H_{12}
Формамид	N-C=O	1,38	1,19	12,8	19,0	1,8
Ацетамид	N-C=O	1,36	1,21	12,8	18,0	2,2
N-Метилформамид	N-C=O	—	—	13,0	18,6	1,8
N-Метилацетамид	N-C=O	1,36	1,21	13,0	17,8	2,2
N-Диметилформамид	N-C=O	—	—	13,2	18,3	1,8
N-Диметилацетамид	N-C=O	—	—	13,2	17,6	2,2
Метилформиат	O-C=O	1,33	1,20	10,6	18,6	1,0
Метилацетат	O-C=O	—	—	11,0	18,1	1,0
Цианамид	N-C=N	1,33	1,17	12,7	26,7	1,2
N-Диметилцианамид	N-C=N	—	—	13,2	26,0	1,4
Метиламин	N-C	1,47	—	7,8	—	—
Диметиламин	C-N-C	—	—	7,8	7,8	0,1
N-Метилметиленимин	C-N=C	1,44	1,30	8,3	16,0	0,3
Ацетонитрил	C-C=N	1,46	1,16	8,0	27,7	0,2
Метанол	C-O	1,43	—	8,0	—	—
Метилвиниловый эфир	C-O-C	—	—	8,0	8,5	0,1
Ацетон	C=O	1,21	—	18,0	—	—
Оксись углерода	C ⁺ =O ⁻	1,13	—	29,7	—	—

довательностей насыщенные атомы углерода (C^α) экранируют взаимное влияние смежных пептидных групп. Иными словами, полипептидные цепи белков состоят из разделенных диэлектриками (C^α) и, следовательно, независимых друг от друга звеньев ($-\text{HN}-\text{CO}-$), имеющих возможность изменить свое состояние лишь под действием внешних факторов.

Для получения представления об электронном строении пептидной, сложноэфирной и цианамидной групп у изолированных молекул и о происходящих изменениях при ассоциациях необходим перевод обсуждаемых геометрических и механических параметров на язык квантовой химии, что требует знания зависимостей между длинами и силовыми постоянными связей NC и CO, с одной стороны, и порядками связей и гибридизацией атомов — с другой. Для их получения использован полуэмпирический подход, подробно изложенный в работах [11, 33] и монографии [37]. На рис. II.2 и II.3 показаны изменения длин и силовых постоянных связей CC, CN и CO с увеличением π -порядка от 0 до 2,0. Как видно из рис. II.2, три кривые параллельны друг другу с экспериментальной точностью ($\pm 0,01$ Å). Кривая CN отстоит от кривой CC на расстоянии $\sim 0,06$ Å, а кривая CO — $\sim 0,11$ Å. Анализ имеющихся экспериментальных данных и результатов расчета колебательных спектров и электронной структуры простейших модельных молекул позволил получить значения длин и силовых постоянных σ -связей CC, CN и CO нулевого π -порядка при всех возможных комбинациях гибридизации атомов углерода, азота и кислорода

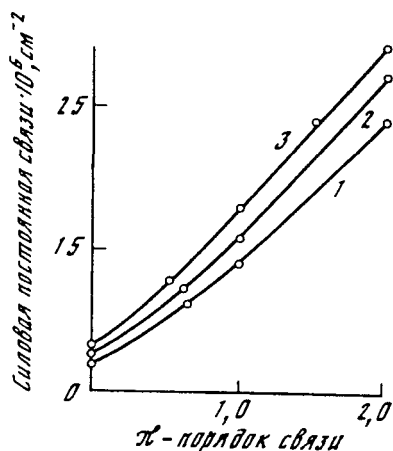
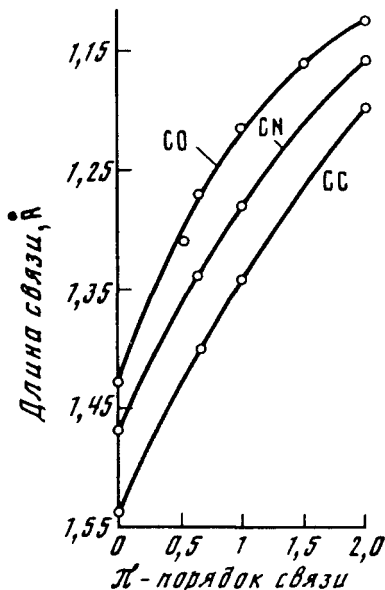


Рис. II.2. Зависимость между длинами и π -порядками связей CC (этан, бензол, этилен, ацетилен), CN (метиламин, пиридин, формальдоксим, ацетонитрил) и CO (метанол, карбонат-ион, соль муравьиной кислоты, ацетон, окись углерода)

Рис. II.3. Зависимость между силовыми постоянными и π -порядками связей

1 — CC (этан, бензол, этилен, ацетилен), 2 — CN (метиламин, пиридин, N-метилметилеимин, ацетонитрил), 3 — CO (метанол, карбонат-ион, ацетон, двуокись углерода, окись углерода)

(табл. II.8, [37]). Оказалось, что длины и силовые постоянные чистых σ -связей CC, CN и CO линейно зависят от среднего процента S -характера связи.

При известных длинах ординарных связей CN и CO с различными гибридизациями атомных орбиталей можно получить зависимости между π -порядком CN и CO и изменением их длин только за счет π -электронов (π -электронное укорочение). Эти зависимости вместе с зависимостью для связи C—C представлены на рис. II.4—II.6 (кривые II). Из S -образного характера кривых II следует, что длины трех рассматриваемых связей неодинаково чувствительны к изменению π -порядка от 0 до 2,0. Увеличение π -порядка в интервале 0—0,3 вызывает небольшие сокращения длин связей ($< 0,01 \text{ Å}$), укладывающиеся в пределы экспериментальных ошибок. Длины связей CC, CN и CO наиболее чувствительны к π -порядку при изменении его в области 0,3—1,0 ($\sim 0,14 \text{ Å}$), причем зависимость здесь практически линейна. Изменение π -порядка от 1,0 до 2,0 приводит к значительно меньшим укорочениям связей, чем от 0 до 1,0 ($\sim 0,03 \text{ Å}$). Обращает внимание близость для трех связей кривых π -электронного укорочения. Если совпадение не случайно, то оно свидетельствует об изoeлектронности π -связей CC, CN и CO. В этом случае аналогия не должна ограничиваться только межатомными расстояниями, а проявляется также между теми свойствами рассматриваемых связей, которые в основном определяются π -электронным слоем. К таким свойствам прежде всего относятся

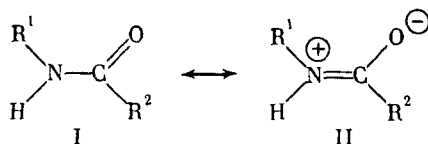
Длины (Å) и силовые постоянные (10^{-6} см^{-2}) σ -связей CC, CN и CO

Тип связи	C-C		C-N		C-O	
	Длина	Силовая постоянная	Длина	Силовая постоянная	Длина	Силовая постоянная
$\text{sp}^3\text{-sp}^3$	1,54	7,0	1,47	7,8	1,43	8,0
$\text{sp}^3\text{-sp}^2$	1,50	7,5	1,44	8,3	1,40	8,5
$\text{sp}^3\text{-sp}$	1,46	8,0	1,40	8,8	1,35	9,0
$\text{sp}^2\text{-sp}^2$	1,48	7,7	1,42	8,5	1,37	8,7
$\text{sp}^2\text{-sp}$	1,43	8,4	1,37	9,2	1,31	9,4
sp-sp	1,38	9,3	1,32	10,1	1,26	10,3

электронные спектры, точнее – полосы поглощения ($\pi\text{-}\pi^*$)-переходов хромофоров CC, CN и CO или более сложных π -систем, включающих эти связи. Сопоставление УФ-спектров десятков соединений, отличающихся кратными связями CC, CN и CO в сопряженных и несопряженных системах, показало, что замены одной связи на другую близкого π -порядка, практически не сказываются на положении соответствующих полос поглощения ($\pi\text{-}\pi^*$)-переходов [38].

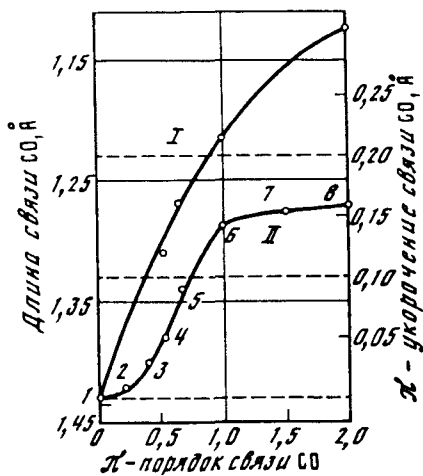
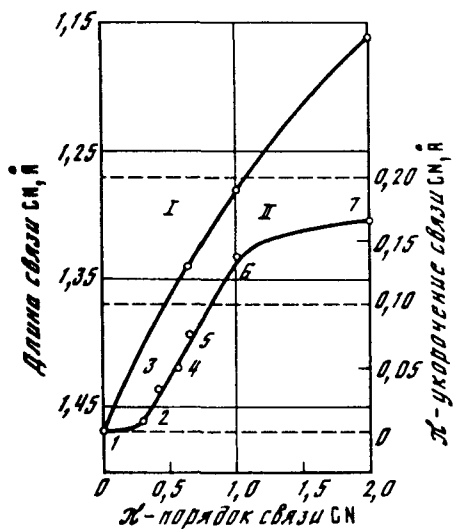
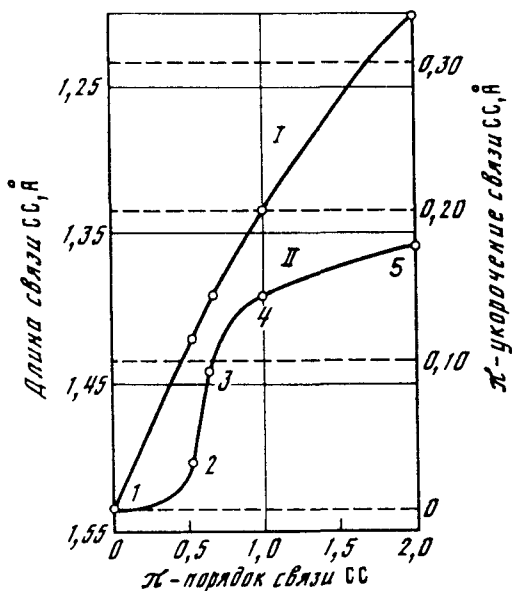
Зависимости π -составляющих силовых постоянных связей CC, CN, и CO от π -порядка даны на рис. II.7. Они построены на основе кривых рис. II.3 и данных табл. II 8. Характер кривых свидетельствует, что силовые постоянные трех связей практически в одинаковой мере чувствительны к изменению π -порядка. Чувствительность же к гибридизации атомов значительно меньше. Однако неучет гибридизации может привести к существенным ошибкам при определении с помощью силовых постоянных π -порядков в сопряженных системах.

Рассмотрим теперь центральный вопрос этой главы – структурную организацию пептидной группы, а также сложноэфирной и цианамидной. Перед тем, как использовать изложенный выше материал, обсудим существующее представление об электронном строении этих групп. В современной химии принято считать, что электронное строение пептидной группы не может быть описано одной классической химической формулой. Для этой цели используется предложенная Полингом еще в 1936 г. резонансная модель, представляющая пептидную группу как суперпозицию канонических молекулярных структур. Согласно Полингу, из большого числа в принципе возможных резонансных форм пептидной группы исключительную роль, приблизительно с равными долями участия (0,6 и 0,4), играют лишь две формы: нейтральная, или ковалентная (I), и цвиттер-ионная (II) [40]:



Р и с. П.4 Кривые π -порядок–длина связи $CC(I)$ и π -порядок– π -укорочение связи $CC(II)$

1 – этан, 2 – графит, 3 – бензол
4 – этилен, 5 – ацетилен

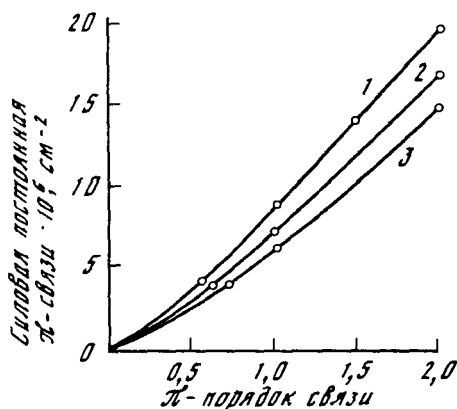


Р и с. П.5. Кривые π -порядок–длина связи $CN(I)$ и π -порядок– π -укорочение связи $CN(II)$

1 – метиламин, 2 – анилин, 3 – пиррол, 4 – цианамид, 5 – пиридин, 6 – формальдоксим, 7 – ацетонитрил

Р и с. П.6. Кривые π -порядок – длина связи $CO(I)$ и π -порядок– π -укорочение связи $CO(II)$

1 – метанол, 2 – фенол, 3 – фуран, 4 – карбонат-ион, 5 – соль муравьиной кислоты, 6 – ацетон, 7 – диоксид углерода, 8 – окись углерода



Р и с. II.7. Зависимости между π -составляющими силовых постоянных и π -порядком связей

1 – CO (метанол, карбонат-ион, ацетон, двуокись углерода, окись углерода), 2 – CN (метиламин, пиридин, N-метилметиленимин, ацетонитрил), 3 – CC (этан, бензол, этилен, ацетилен)

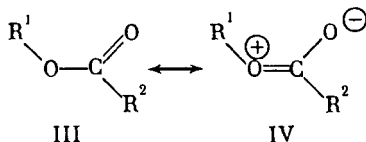
Уже много десятилетий такое представление является общепринятым, по существу единственным. Оно, действительно, объясняет физические и химические свойства амидов и пептидных групп в сложных молекулах. Стабилизация элект-

ронного строения пептидной группы в виде суперпозиции форм I и II осуществляется за счет взаимодействия неподеленной пары электронов атома N с π -электронами связи C=O. Модель Полинга подтверждается многочисленными данными рентгеноструктурного анализа, согласно которым длины связи N–C в амидах и пептидах короче, чем в аминах, а длина связи C=O больше, чем в альдегидах и кетонах, плоским строением пептидной группы, а также ее существованием в *транс*- и *цис*-конфигурациях, разделенных высоким потенциальным барьером. Резонансная модель не противоречит колебательным и электронным спектрам ассоциированных амидов и пептидов. Так, понижение частоты валентного колебания C=O (полоса амид I; табл. II.4) и повышение частоты валентного колебания N–C (полоса амид II) согласуется со снижением π -порядка первой связи и появлением π -порядка второй. Резонно также связывают гипсохромное смещение УФ-полос поглощения амидов с большим вкладом в распределение электронной плотности цвиттер-ионной формы. Осцилляцией между двумя альтернативными каноническими структурами I и II хорошо объясняется и главная особенность пептидной группы – лабильность ее электронного строения.

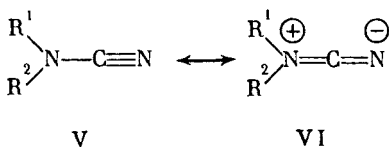
Существенный вклад в распределение электронной плотности пептидной группы цвиттер-ионной формы (II) должен сказаться в увеличении отрицательного заряда на карбонильном кислороде (по сравнению с ацетоном), что и подтверждается результатами расчета интенсивностей ИК-полос поглощения (см. табл. II.3 и II.6). Это полностью согласуется также с таким известным экспериментальным фактором, как предпочтительное протонирование амидов и пептидов по атому кислорода [41], а не азота, как это обычно имеет место. Амиды являются слабыми основаниями значения pK_a , например, у ацетамида и N-метилацетамида составляют соответственно 0,35 и 1,0. В то же время они могут выступать и как слабые кислоты, pE_a кислотной диссоциации у формамида равно 17,2, а у ацетамида – 17,6 [42]. В соответствии с этим пептидная группа проявляет двойственную способность к образованию водородных связей, выступая одновременно в качестве акцептора протона (C=O) и его донора (N–H). Образование водородных связей ведет к еще большей поляризации групп,

увеличению порядка связи N–C, уменьшению порядка C=O, соответствующим изменениям длин таких связей и повышению барьера внутреннего вращения вокруг связи N–C. Перечисленные опытные факты можно объяснить возрастанием доли участия в резонансе формы II.

В сложных эфирах, как и в амидах, возможно взаимодействие неподеленных пар эфирного атома кислорода с π -электронами карбонильной группы. Поэтому результирующее распределение электронной плотности в сложноэфирной группе можно по аналогии с пептидной группой также представить суперпозицией двух форм – ковалентной (I) и цвиттер-ионной (II), что и было сделано Полингом:



Из-за более высокой по сравнению с атомом N электроотрицательности атома O вклад структуры II уменьшился до 15% [40]. В принципе с помощью тех же резонансных структур описывается электронное строение и цианамидов:



Если структурная организация пептидной группы (как сложноэфирной и цианамидной групп) действительно адекватно описывается резонансной моделью Полинга с ее ковалентной и цвиттер-ионной формами (I и II), то происходящие под действием внешних сил изменения внутренних характеристик группы должны являться следствием перераспределения электронной плотности в пределах двух резонансных структур ($\text{I} \leftrightarrow \text{II}$). Также очевидно, что модель Полинга как молекулярная должна прежде всего правильно отражать исходное состояние, т.е. электронное распределение в изолированной молекуле. При справедливости представления о пептидной группе как о суперпозиции с приблизительно одинаковыми весами двух резонансных структур, существенно отличающихся по порядкам связей, длины N–C и C=O в молекулах свободных амидов должны иметь значения, промежуточные между длинами ординарной и двойной связей. То же самое должно наблюдаться и в отношении силовых постоянных. Однако, как видно из табл. II.7, если геометрические и механические параметры связи N–C в амидах действительно отвечают промежуточным значениям, то параметры C=O соответствуют значениям в ацетоне, т.е. чисто двойной связи. Более того, в некоторых случаях связь C=O в амидах даже короче, а силовая постоянная выше чем в ацетоне. Подобная ситуация имеет место в сложных эфирах и цианамидах (табл. II.7).

В табл. II.9 приведены величины π -порядков пептидной, сложноэфирной и цианамидной групп, полученные на основе данных табл. II.7 и со-

π-Порядки связей в пептидной, сложноэфирной
и цианамидной группах

Молекула	π-Порядок связей по длинам связи по силовым постоянным			
N-C=O				
Формамид	0,5	1,2	0,6	1,1
Ацетамид	0,6	1,0	0,6	1,0
N-Метилформамид	—	—	0,6	1,1
N-Метилацетамид	0,6	1,0	0,6	1,0
N-Диметилформамид	—	—	0,7	1,0
N-Диметилацетамид	—	—	0,7	1,0
O-C=O				
Метилформиат	0,4	1,1	0,3	1,1
Метилацетат	—	—	0,4	1,0
N-C≡N				
Цианамид	0,5	1,9	0,5	2,0
N-Диметилцианамид	—	—	0,6	1,9

отношений длина связи–π-порядок связи (см. рис. II.5 и II.6) и силовая постоянная–π-порядок связи (рис. II.7) с учетом вклада σ-электронов и гибридизации атомов (табл. II.8). Представленные π-порядки связей в свободном состоянии молекул, полученные двумя независимыми методами, хорошо согласуются между собой. Они свидетельствуют о том, что электронное распределение в неассоциированных молекулах амидов, сложных эфиров и цианамидов не отвечает резонансной модели Полинга: увеличение π-порядков связей N–C и O–C происходит не за счет уменьшения π-порядков связей C=O и C=N; последние не только не меньше, но в ряде случаев больше π-порядков связей у соответствующих модельных соединений.

Естественен вопрос, чем обусловлено такое распределение электронной плотности? Прямо ответить на него с помощью наблюдаемых геометрических параметров молекул и результатов расчета частот и интенсивностей колебательных спектров нельзя, поскольку теория последних базируется на механической модели гармонического осциллятора, а соотношения между длинами, силовыми постоянными и порядками связей являются эмпирическими. Значение полученных данных заключается в постановке самого вопроса, а ответ следует искать с помощью методов квантовой химии. Молекула формамида была объектом многочисленных исследований, использовавших полуэмпирические и неэмпирические квантовохимические методы [1, 22, 23, 43–46]. Однако все расчеты выполнялись с учетом π-электронов связи C=O и *n*-электронов атома N. Такое приближение по существу уже исходит из признания резонансной модели Полинга и, следовательно, исключает объективную интерпретацию опыт-

ных данных, так как заведомо предопределяет результат: увеличение π -порядка N—C и уменьшение π -порядка C=O связей.

Выскажу соображение о структурной организации пептидной группы, обуславливающей ее свойства, в частности объясняющей данные, приведенные в табл. II.9. Особенность электронного строения пептидной группы, безусловно, в большой мере определяется большой подвижностью неподеленной пары электронов атома N и высокой акцепторной способностью группы C=O. Прямое взаимодействие аминогруппы и карбонила приводит к смещению n -электронов азота в направлении связи N—C и увеличению ее порядка. В результате изменяется гибридизация атома N, пептидная группа приобретает плоскую или близкую к ней структуру, уменьшается отрицательный заряд на азоте и снижается дипольный момент связи N—H. В этом отношении рассматриваемая ниже модель пептидной связи согласуется с моделью Полинга. Если донорная способность одной части молекулы меньше, чем у аминогруппы, то при той же электроноакцепторной способности другой части можно ожидать не столь значительное смещение электронной плотности на промежуточную связь. Это действительно наблюдается в молекулах акролеина ($\text{H}_2\text{C}=\text{CHCHO}$) и пропионаля ($\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CHO}$) [47], где π -электроны C=C и C $\equiv$ C связей менее подвижны, чем n -электроны аминогруппы [48, 49]. Акцепторной способности группы C=O здесь оказывается недостаточно для значительной делокализации π -электронов, о чем свидетельствуют геометрические данные и результаты теоретического анализа колебательных спектров [47, 50]. Смещение в пептидной группе n -электронов азота в сторону должно привести к их взаимодействию с π -электронами, что, казалось бы, неизбежно увеличит π -порядок N—C и уменьшит π -порядок C=O связей. Однако, как отмечалось, такое предположение не согласуется с наблюдаемой длиной карбонильной связи и ее силовой постоянной (табл. II.7). Очевидно, для объяснения данного факта недостаточно учитывать только взаимодействие между n -электронами азота и π -электронами карбонила, как это делается в резонансной модели Полинга и квантовохимических расчетах. Необходимо принимать во внимание также неподеленные пары электронов атома кислорода.

В карбонильных соединениях, таких, как кетоны, n -электроны атома O являются наиболее лабильными, на что указывает расположение УФ-полос поглощения, отвечающих ($n-\pi^*$)-переходам в области 280–200 нм [51–54]. В амидах свойства n -электронов кислорода значительно отличаются от таковых в кетонах, о чем свидетельствует bathochromic смещение полос ($n-\pi^*$)-переходов в области 200–220 нм [1, 51, 55–57]. Смещения существенны и говорят о более прочной связи неподеленных пар электронов атома азота с атомами O в амидах по сравнению с модельными соединениями. УФ-полосы поглощения ($n-\pi^*$)-переходов амидов попадают в область ($n-\pi^*$)-перехода несопряженной связи C=C. Сдвиг полосы может быть вызван изменением гибридизации атома кислорода в пептидной группе и принятием им состояния, промежуточного между sp^2 и sp^3 , которое ведет к нарушению ортогональности орбиталей n -электронов C=O и возникновению взаимодействия между ними, т.е. перегибридизации. В ре-

зультате неподеленные пары электронов атома кислорода приобретают частично связывающий характер, что и компенсирует в пептидной группе уменьшение π -электронной плотности на связи $C=O$, способствуя тем самым сохранению ее длины, π -порядка и силовой постоянной. О значительном вкладе неподеленных пар электронов атома кислорода в электронную структуру пептидной группы свидетельствуют также те большие изменения в распределении электронной плотности, которые происходят в этой группе при образовании межмолекулярных водородных связей, т.е. при вовлечении n -электронов атома O во внешние взаимодействия.

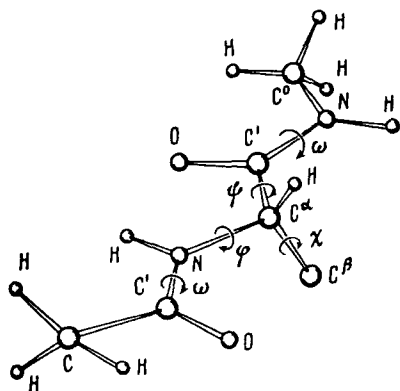
Таким образом, согласно предлагаемой новой модели структурной организации пептидной группы, высокая лабильность ее электронного строения определяется взаимодействиями между неподеленной парой электронов атома N, π -электронами связи $C=O$ и неподеленными парами электронов атома O. Последние не учитываются в модели Полинга. Электронные структуры сложноэфирной и цианамидной групп могут быть описаны подобным образом.

Глава 5

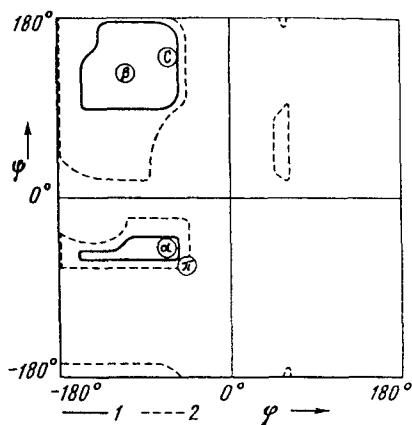
КОНФОРМАЦИИ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ

В решении задачи структурной организации белков изучение взаимодействий между валентно-несвязанными атомами в свободных аминокислотных остатках представляет особый интерес. Эти взаимодействия определяют у каждого стандартного остатка его конформационную потенцию, которая при укладке белковой цепи в нативную трехмерную структуру реализуется в виде определенного конформационного состояния. Знание максимальных конформационных возможностей свободного звена полипептидной цепи является исходным в последующем изучении средних и дальних межостаточных взаимодействий, благодаря чему оно составляет основу метода структурного анализа пептидов и белков.

Простейшими молекулами, моделирующими конформационные возможности свободных аминокислотных остатков, являются метиламиды N-ацетил- α -аминокислот ($H_3C-CONH-C^{\alpha}HR-CONH-CH_3$). В последующем изложении ради краткости будем называть их по числу остатков монопептидами. Пространственное строение этих молекул при выбранных значениях длин химических связей и валентных углов определяется двугранными углами вращения вокруг связей $N-C^{\alpha}(\varphi)$ и $C^{\alpha}-C'(\psi)$ основной цепи и связей $C^{\alpha}-C^{\beta}$, $C^{\beta}-C^{\gamma}$ и т.д. ($\chi_1-\chi_2, \dots$) боковой цепи (рис. II.8). Обычно предполагается, что пептидные группы являются плоскими и находятся в *транс*-конфигурации ($\omega = 180^\circ$). Первое теоретическое исследование конформационных возможностей простейших монопептидов глицина ($R=H$) и аланина ($R=CH_3$) было выполнено в 1963 г. Рамачандраном и соавт. [58] Ис-



Р и с. II.8. Расчетная модель метиламидов N-ацетил- α -аминокислот с плоскими *транс*-конфигурациями пептидных групп ($\omega = 180^\circ$) в конформации с двугранными углами $\varphi = \psi = 180^\circ$



Р и с. II.9. Разрешенные области двугранных углов φ, ψ основной цепи метиламида N-ацетил-L-аланина с нормальными (1) и экстремальными (2) расстояниями между валентно-несвязанными атомами [58]

Обозначения $\alpha, \beta, \gamma, \pi$, обведенные кружками, отвечают значениям углов φ, ψ α -спирали, β -структуры, коллагена и π -спирали соответственно

пользуя модель жестких сферических атомов, авторы рассчитали для этих молекул области разрешенных и запрещенных конформационных состояний, однозначно определяемых в данном случае значениями лишь двух переменных – углов φ и ψ . Для каждого вида пар валентно-несвязанных атомов использовалось два набора равновесных расстояний – "нормальный" и "экстремальный", в котором сумма контактных радиусов атомов была несколько меньше обычно наблюдаемой. Если в конформации монопептида все межатомные расстояния оказывались больше нормальных значений, то она считалась полностью разрешенной. Если же хотя бы одно расстояние между атомами попадало в интервал между нормальным и экстремальным значениями или было меньше предельно допустимого значения, конформация предполагалась частично разрешенной в первом случае и полностью запрещенной во втором. Результаты расчета метиламида N-ацетил-L-аланина [58] представлены на рис. II.9. Как видно из рисунка, большая часть потенциальной поверхности даже при использовании экстремального набора равновесных расстояний между валентно-несвязанными атомами оказывается запрещенной. Интересно, что значения конформационных параметров известных в то время регулярных полипептидных структур попали в разрешенные области свободного монопептида. Из полученных результатов также следовал вывод о большей стабильности правой α -спирали полипептидов по сравнению с левой α -спиралью.

В изучении структурной организации белков и синтетических полипептидов работа Рамачандрана и соав. [58] подобно работам Полинга и Кори [59, 60] явилась одним из тех первых скатывающихся с горы камней,

за которыми следует обвал. Ценность этого исследования не только в полученных авторами конкретных результатов. Работа Рамачандрана и сотру- рудников, пожалуй, впервые так наглядно раскрыла огромные потенци- альные возможности теоретического конформационного анализа пептидов и продемонстрировала наличие у них прямой зависимости между внутри- остаточными и межостаточными взаимодействиями. Эффект оказался осо- бенно убедительным, поскольку он был достигнут крайне простыми сред- ствами. Уже через 2–3 года в печати появляется большая серия работ, воспроизводящих, расширяющих и углубляющих исследование Рамачанд- рана и сотру- рудников.

П. Де Сантис и соавт. [61] в 1965 г. рассчитывают регулярные кон- формации полипептидов, используя для описания взаимодействий валентно- несвязанных атомов не модель жестких сфер, а потенциальные функ- ции невалентных взаимодействий. Карты ϕ – ψ Рамачандрана приобретают контуры эквипотенциальных сечений и позволяют теперь уже делать количественную сопоставительную оценку потенциальной энергии любого конформационного состояния свободного монопептида или соответствующего звена полипептида. Д. Брант и П. Флори в том же году с помощью конформационных карт провели статистические расчеты размеров клубков полипептидов и пришли к заключению о необходимости, помимо нева- лентных взаимодействий, учитывать также электростатические взаимо- действия, что они и сделали в диполь-дипольном приближении [62]. В ряде работ Шераги и соавт. [63–66] были исследованы спиральные конфор- мации гомополипептидов природных α -аминокислот с применением как мо- дели жестких сфер, так и потенциальных функций. Новым в этих работах явился учет с помощью потенциала Липпинкота и Шредера возможности образования пептидных водородных связей.

В упомянутых исследованиях основное внимание уделялось спиральным конформациям гомополипептидов, на которые в то время возлагали боль- шие надежды как на ближайших структурных аналогов белков. Действи- тельно, пространственное строение синтетических полипептидов и белков определяется одними и теми же видами взаимодействий между валентно- несвязанными атомами и одинаковой природой этих взаимодействий. Химическая регулярность синтетических полипептидов допускает реализа- цию ограниченного числа периодических структур, которые, как показали рассмотренные исследования, сравнительно легко оцениваются теорети- чески. Они-то прежде всего и привлекали к себе внимание, поскольку трехмерные структуры белков представлялись в соответствии с концеп- цией Полинга–Кори набором регулярных вторичных структур. Автор не стоял на этих позициях и уже тогда был убежден, что гетерогенность аминокислотных последовательностей белков должна вести не только к регулярным, но главным образом к множеству аperiодических структур. Наши исследования в данной области, начавшиеся в 1968 г. [20] также под влиянием работы Рамачандрана и соавт. [58], имели иное назначение. Они были направлены исключительно на изучение конформационных воз- можностей свободных монопептидов и после своего завершения составили содержание первого этапа на пути к решению структурной проблемы белковых молекул. Главные цели этих первых конформационных иссле-

дований, объединенных и поляризованных единой сверхзадачей, формулировались тогда следующим образом: 1) изучение конформационных возможностей основных и боковых цепей свободных монопептидов всех 20 стандартных аминокислот, нахождение для каждого из них набора низкоэнергетических оптимальных конформаций и оценка влияния природы растворителя на положение конформационного равновесия; 2) сопоставление результатов теоретического конформационного анализа монопептидов с данными их экспериментального исследования; 3) соотнесение оптимальных низкоэнергетических конформаций свободных монопептидов с конформационными состояниями аминокислотных остатков в нативных трехмерных структурах белков. Достижение этих целей сделает возможным переход к следующему этапу работ, посвященному изучению средних межостаточных взаимодействий.

5.1 МЕТИЛАМИДЫ N-АЦЕТИЛ- α -АМИНОКИСЛОТ

Первыми нашими объектами теоретического конформационного анализа явились метиламиды N-ацетилглицина, N-ацетил-L-аланина, N-ацетил-L-валина и N-ацетил-L-пролина [20, 67]. Выбор был продиктован предположением о том, что изучение пространственного строения молекул этой серии выявит верхний и нижний пределы конформационных возможностей основных цепей монопептидов всех стандартных аминокислот. В работах Шараги и соавт. [63–65] было показано, что свобода вращения вокруг связей N–C α и C α –C' существенно различается только в следующих случаях: при отсутствии заместителя у атома C α (монопептид Gly), при наличии не более одного заместителя при атоме C β (Ala), при наличии двух заместителей при атоме C β (Val) и при замыкании углеводородной цепочкой (–CH $_2$) $_3$ атомов N и C α (Pro).

Конформационная потенциальная энергия монопептидов Gly, Ala, Val и Pro была представлена в виде суммы независимых вкладов ван-дер-ваальсовых $U_{\text{вдв}}$, электростатических $U_{\text{эл}}$ и торсионных $U_{\text{торс}}$ взаимодействий, а также водородных связей $U_{\text{вс}}$ и деформаций валентных углов $U_{\text{угл}}$. Энергия ван-дер-ваальсовых взаимодействий описывалась потенциалом Букингема с параметрами Дашевского. Учет электростатических взаимодействий произведен в монополярном приближении по закону Кулона с парциальными зарядами атомов, предложенными Скоттом и Шерагой [65] в 1966 г. и диэлектрической проницаемостью ϵ , меняющейся в пределах от 4 до 10. Торсионная энергия рассчитывалась при использовании величин барьеров внутреннего вращения $U_0^{\phi} = 0,2$, $U_0^{\psi} = 0,6$ и $U_0^{\chi} = 2,8$ ккал/моль. Энергия внутримолекулярной водородной связи N–H...O–C оценивалась по потенциалу, аппроксимированному кривой Морзе, с параметрами $r_0(\text{H...O}) = 1,8\text{\AA}$, $n = 3\text{\AA}^{-1}$ и $D = 4,0, 2,0$ и $0,5$ ккал/моль. Энергия деформации валентных углов определялась по формуле Гука с использованием следующих значений коэффициентов упругости K_{α} : 30, 70 и 50 ккал/(моль рад) соответственно для центральных атомов углерода в гибридизации sp 3 (C α , C β), sp 2 (C') и атома азота основной цепи. Значения длин связей, а в начале

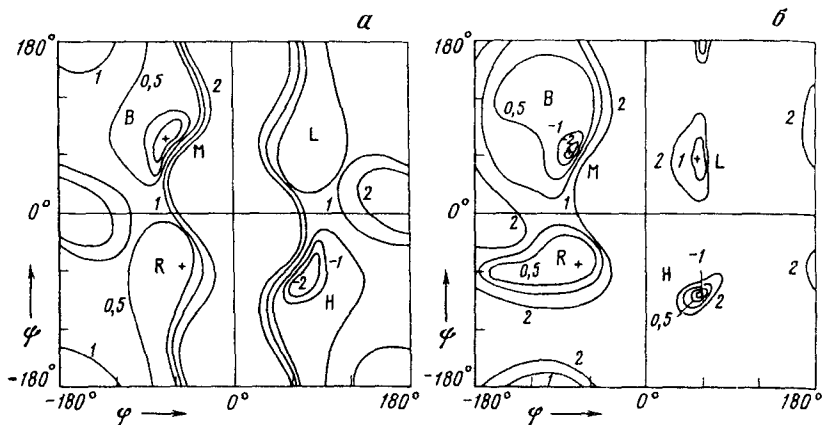


Рис II 10 Конформационные карты метиламидов N-ацетилглицина (а) и N-ацетил-L-аланина (б)

Знаком плюс отмечены положения оптимальных конформаций. За нуль отсчета в обеих картах принята энергия в гочке $\varphi = \psi = -60^\circ$. Контуры эквипотенциальных сечений проведены при значениях энергии -2,0, -1,0, 0,5, 1,0 и 2,0 ккал/моль.

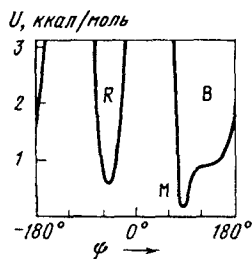


Рис II 11 Кривая потенциальной энергии метиламида N-ацетил-L-пролина

расчета и значения валентных углов, соответствовали параметрам Полинга-Кори.

Конформационный анализ каждой молекулы метиламида N-ацетил- α -аминокислоты начинался с построения при изменении углов φ и ψ конформационной карты, которая давала ориентировочное представление о поверхности потенциальной энергии молекулы и расположении областей самой низкой энергии. Последние выбирались в качестве нулевых приближений для поиска энергетических минимумов при вариации как двугранных углов φ, ψ, χ , так и валентных углов пептидных групп и углов при атоме C^α . Затем, используя длины связей Полинга-Кори и найденные теоретические значения валентных углов, усредненные по оптимальным конформациям каждой молекулы, вновь строились конформационные карты φ - ψ . Рассмотрение полученных результатов начнем в обратном порядке, т.е. с уточненных конформационных карт.

Представление о потенциальной поверхности глицинового и аланинового монопептидов дают карты φ - ψ , приведенные на рис II.10. Карта производного валина подобна аланиновой карте, однако имеет несколько

меньшую площадь низкой энергии. Так, области, ограниченные контуром 1,0 ккал/моль, занимают 6% всей площади конформационной карты ϕ - ψ монопептида Val, в то время как на карте производного Ala эти области составляют 13%, а на карте Gly – 60%. У молекулы метиламида N-ацетил-L-пролина вращение вокруг связи N-C α запрещено ($\phi \sim -60^\circ$), и поэтому ее конформационные возможности определяются лишь одним параметром – ψ . Потенциальная кривая пролинового монопептида представлена на рис. II.11.

Несмотря на бросающиеся в глаза различия приведенных на рис. II.10, II.11 карт, потенциальные поверхности монопептидов Gly, Ala, Val и Pro обладают рядом общих черт, отражающих наличие определенного единства в химическом строении этих молекул и имеющих, как увидим позднее, большое значение в решении рассматриваемой задачи. Наиболее существенная общая черта – одинаковое расположение на всех конформационных картах низкоэнергетических областей. У глицинового производного таких областей четыре, точнее, две дважды вырожденных – R(L) и B(H). У аланинового и валинового производных вследствие появления асимметрии у атома C α вырождение снимается и низкоэнергетические области, оставаясь на тех же местах конформационной карты, существенно меняются по своей площади и относительной энергии. Наиболее предпочтительными в отношении энтропии и внутренней энергии остаются конформации, значения углов ϕ , ψ которых попадают в самые широкие и низкоэнергетические области B и R. Что же касается областей L и H, то их относительная энергия возрастает, а площади резко сокращаются. Потенциальная кривая пролинового монопептида, по существу, представляет собой сечение потенциальной поверхности производного аланина при $\phi = -60^\circ$. Она также содержит две уже знакомые области низкой энергии B и R.

На конформационных картах монопептидов, помимо отмеченных низкоэнергетических областей, наблюдаются еще две узкие и самые глубокие потенциальные ямы с центрами при $\phi \sim -60^\circ$, $\psi \sim 60^\circ$ и $\phi \sim 60^\circ$, $\psi \sim -60^\circ$. Отвечающая первому минимуму конформация M была впервые постулирована С. Мидзусимой и Т. Шиманучи в 1961 г [68], а отвечающая второму минимуму конформация H – М. Хаггинсом для структуры α -кератина [69]. Конформации M и H представляют собой два возможных для метиламидов N-ацетил- α -аминокислот состояния с внутримолекулярными водородными связями (рис. II.12). Они отличаются друг от друга ориентацией боковой цепи аминокислотного остатка относительно семичленного цикла, замыкаемого водородной связью типа 3 $\rightarrow$ 1 (между группой N-H третьего остатка и O=C первого, если рассматривать монопептид как звено полипептидной цепи). Позднее экспериментальному исследованию этих форм были посвящены работы [70–82].

Хорошо известно, что конформационное состояние молекул, особенно таких лабильных, как молекулы пептидов, существенно зависит от природы растворителя. Естественен вопрос – какой же смысл в этом случае имеют результаты теоретического рассмотрения пространственного строения изолированной молекулы, или, как часто принято говорить, молекулы в вакууме? Очевидно, результаты такого анализа были бы полностью лишены физического смысла, если бы окружающая среда опре-

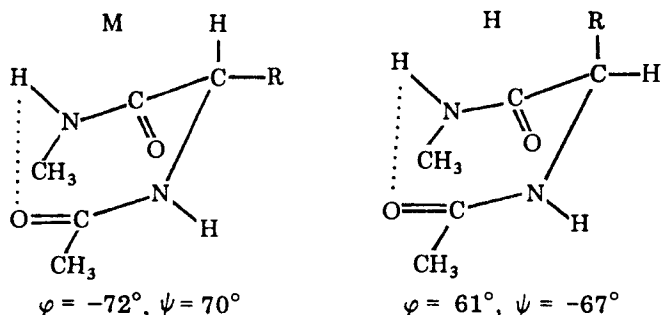


Рис II 12. Конформации М и Н метиламидов N-ацетил- α -аминокислот с внутримолекулярными водородными связями

деляла пространственное строение находящейся в ней молекулы подобно тому, как скульптор определяет форму своего произведения. Однако механизм воздействия среды совершенно иной. Она не создает у растворенных молекул новой пространственной формы, а влияет лишь на положение равновесия конформаций, обусловленных только внутренним строением самих молекул, смещая его в сторону тех структур, которые лучше всего взаимодействуют с молекулами растворителя. Следовательно, теоретический конформационный анализ изолированной молекулы выявляет весь набор присущих ей пространственных форм и определяет порядок их расположения в энергетической шкале согласно внутримолекулярным взаимодействиям. Влияние растворителя сказывается в перераспределении этого порядка, что вполне возможно из-за небольшого различия в энергии оптимальных форм лабильных молекул.

В рамках механической модели молекулы автором данной монографии и соавт. [83] была рассмотрена возможность учета влияния растворителя на конформационное равновесие пептидов соединений. Мы попытались это сделать путем различной параметризации потенциальных функций некоторых видов взаимодействий валентно-несвязанных атомов. Из энергетических вкладов различных видов взаимодействий в общую конформационную энергию молекулы составляющие $U_{\text{вдв}}$, $U_{\text{угл}}$ и $U_{\text{горс}}$, по-видимому, не будут претерпевать существенных изменений под влиянием растворителя. Они описывают такие взаимодействия между атомами и связями, которые являются значительными лишь при малых расстояниях ($< 2,5\text{--}3,0$ Å). Энергия же водородной связи сильно зависит от растворителя. Предложенный нами потенциал водородной связи [20] легко учитывает это влияние путем вариации параметра D энергии диссоциации водородной связи. По экспериментальным оценкам Дж. Шеллмана [84], Т. Клотца и И. Франзена [85] энергия димеризации N-метилацетамида в CCl_4 составляет около 4,0, в CHCl_3 – 2,0 и в воде – 0–1,0 ккал/моль. Исходя из этого в конформационном анализе монопептидов в неполярной среде была принята величина $D = 4,0$ ккал/моль, а в слабо- и сильнополярной (водной) средах – 2,0 и 0,5 ккал/моль соответственно.

Влияние растворителя на электростатические взаимодействия учитывалось использованием в расчетах разных значений диэлектрической про

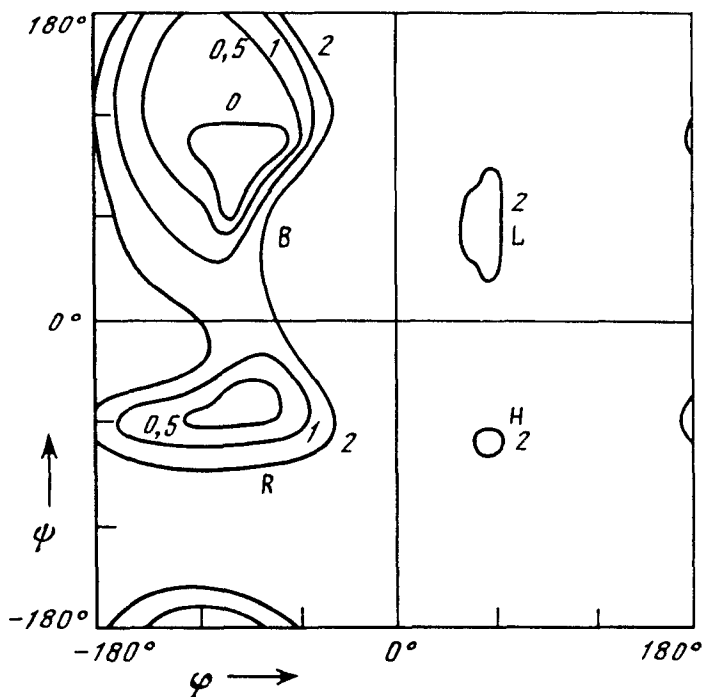


Рис. II.13 Конформационная карта метиламида N-ацетил-L-аланина, рассчитанная с параметрами полярной среды

проницаемости ϵ . Для неполярного растворителя наиболее приемлемо $\epsilon = 4$, соответствующее значению высокочастотной диэлектрической проницаемости алкиламидов. В водных средах величина ϵ должна быть больше. Следуя С. Кримму и Дж. Марку [86], в расчетах, отвечающих условиям водной среды, нами принималась величина $\epsilon = 10$. Несомненно, учет влияния растворителя только путем модификации потенциалов, описывающих электростатические взаимодействия и водородные связи, не представляется достаточно обоснованным и не отличается глубиной. Однако оказалось, что даже такой способ правильно улавливает тенденцию смещения информационного равновесия и приводит к разумным количественным результатам.

Описанные данные теоретического конформационного анализа монопептидов и приведенные на рис. II.10, II.11 карты ϕ - ψ были получены с параметрами, соответствующими условиям неполярной среды, где сильны внутримолекулярные водородные связи и электростатические взаимодействия. На рис. II.13 приведена конформационная карта метиламида N-ацетил-L-аланина, рассчитанная с параметрами полярной среды ($D = 0,5$ ккал/моль, $\epsilon = 10$). При ее сравнении с картой той же молекулы в полярном окружении обращает на себя внимание исчезновение самых высокоэнергетических областей, отвечающих свернутым конформациям M и H с внутримолекулярными водородными связями (рис. II.12). На карте

Энергия $U_{\text{общ}}$ оптимальных конформаций метиламида N-ацетил-L-аланина

Конформация			$U_{\text{общ}}$, ккал/моль			
Форма основной цепи	Двугранный угол, град		$D = 4;$ $\epsilon = 4$	$D = 2;$ $\epsilon = 7$	$D = 0,5;$ $\epsilon = 10$	$D = 0,$ $\epsilon = \infty$
	φ	ψ				
R	-97	-54	0	0	0	0
L	52	60	1,2	1,1	1,1	1,0
B	-117	150	-1,1	-0,5	-0,3	0,3
H	61	-67	-3,8	-1,2	1,2	-
M	-72	70	-3,2	-0,8	-	-

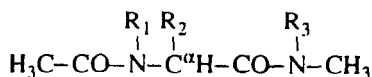
φ - ψ , построенной для монопептида Ala в водной среде, обнаруживается уменьшение потенциальной энергии и расширение области R.

В табл. II.10 приведены величины энергии оптимальных конформаций этой молекулы, демонстрирующие тенденцию смещения положения равновесия по мере ослабления водородных связей и электростатических взаимодействий, т.е. при переходе от неполярной среды к водному окружению. При значениях $D = 0,5$ ккал/моль и $\epsilon = 10$ минимум M отсутствует, а H на 1,0–1,5 ккал/моль выше энергии конформации R и B. Следовательно, в водных растворах метиламида N-ацетил-L-аланина, согласно результатам расчета, содержание свернутых форм с внутримолекулярными водородными связями практически исключено.

Проведенный конформационный анализ аланинового монопептида позволил оценить термодинамические функции различных форм и определить положение конформационного равновесия в различных растворителях. Энтропия определялась по формуле $S = \bar{U} + kT \cdot \ln Z$, где: $\bar{U}$ – средняя внутренняя энергия; Z – статистическая сумма вероятностей состояния. Величина Z является функцией разбиения конформационного пространства, поэтому рассчитанные величины S имеют относительный смысл. В нашем случае вариации углов φ и ψ составили 20° . Значения энтропии мало чувствительны к учету электростатики. Так, энтропия R-, B- и L-форм молекулы при $\epsilon = 4$ составляет 8,0, при $\epsilon = 10$ – 8,1 и при $\epsilon = \infty$ – 8,4 кал/моль · град. Это закономерно, так как энтропия определяется прежде всего всей площадью низкой энергии на конформационной карте. Ориентировочная оценка энтропии свернутых форм M и H составляет 1,5–2,0 кал/моль · град. Следовательно, $\Delta S = S_{\text{разв}} - S_{\text{св}} = -6$ – -7 кал/моль · град. В табл. II.10 приведены значения $U_{\text{общ}}$ самых выгодных оптимальных конформаций. Разница между усредненными значениями $U_{\text{общ}}$ несколько больше – приблизительно на 0,2–0,3 ккал/моль. Таким образом, согласно теоретической оценке, разность внутренней энергии ΔU между энергиями лучшей свернутой формы H и лучшей развернутой формы B в CCl_4 составляет 2,7–2,9 ккал/моль. Эксперимент дает 3,0 ккал/моль [87]. Разность свободной энергии свернутых и развер-

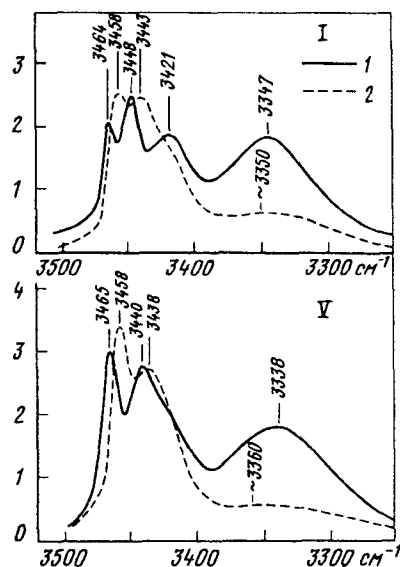
нутых форм в CCl_4 равна 0,7–1,0 ккал/моль. Это приводит к конформационному равновесию, в котором 70–80% молекул находятся в свернутых (М, Н) формах. В растворах CHCl_3 картина обратная: разность свободной энергии в этом случае также составляет ~1,0 ккал/моль, но в пользу развернутых форм R, В, L. Поэтому содержание свернутых форм в хлороформе должно составлять ~20%.

Эти выводы теоретического анализа находятся в хорошем согласии с данными экспериментальных исследований, которые были специально поставлены нами для проверки результатов расчета монопептидов. К изучению пространственного строения представительного ряда метиламидов N-ацетил- α -аминокислот и их N-метильных производных, перечисленных ниже, были привлечены методы инфракрасной спектроскопии, ядерного магнитного резонанса, дисперсии оптического вращения, кругового дихроизма, а также дипольных моментов и газожидкостной осмометрии [88]:



- | | | |
|------|-------------------------------|--|
| I | Ac-L-Ala-NHMe; | $\text{R}_1 = \text{R}_3 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{CH}_3$ |
| II | Ac-L-Ala-NMe ₂ ; | $\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{CH}_3$ |
| III | Ac-L-MeAla-NHMe; | $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{CH}_3, \text{R}_3 = \text{H}$ |
| IV | Ac-L-MeAla-NMe ₂ ; | $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{CH}_3$ |
| V | Ac-L-Val-NHMe; | $\text{R}_1 = \text{R}_3 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$ |
| VI | Ac-L-Val-NMe ₂ ; | $\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2, \text{R}_3 = \text{CH}_3$ |
| VII | Ac-L-MeVal-NHMe; | $\text{R}_1 = \text{CH}_3, \text{R}_2 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2, \text{R}_3 = \text{H}$ |
| VIII | Ac-L-MeVal-NMe ₂ ; | $\text{R}_1 = \text{R}_3 = \text{CH}_3, \text{R}_2 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$ |
| IX | Ac-L-Pro-NHMe; | $\text{R}_1 + \text{R}_2 = -(\text{CH}_2)_3-, \text{R}_3 = \text{H}$ |
| X | Ac-L-Pro-NMe ₂ ; | $\text{R}_1 + \text{R}_2 = -(\text{CH}_2)_3-, \text{R}_3 = \text{CH}_3$ |
| XI | Ac-Gly-NHMe; | $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{H}$ |
| XII | Ac-L-Phe-NHMe; | $\text{R}_1 = \text{R}_3 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ |

На рис. II.14 приведены ИК-спектры в области валентных колебаний NH разбавленных растворов, исключающих межмолекулярную ассоциацию (~10⁻⁴ моль/л) монопептидов аланина (I) и валина (V) в четыреххлористом углероде и хлороформе. Диффузные полосы поглощения в правой части спектров относятся к колебаниям связи N-H, вовлеченной в водородное связывание свернутых конформаций Н и М монопептидов. Из рисунка хорошо видно меньшее содержание этих конформаций в растворе CHCl_3 по сравнению с CCl_4 . Для количественной оценки содержания свернутых и развернутых форм монопептидов I, III, V, VII, IX и XII в разбавленных растворах CCl_4 и CHCl_3 были измерены после надежной идентификации полос их интегральные интенсивности в области валентных колебаний N-H и определено число групп N-H, отвечающих каждой полосе. Резуль-

$\epsilon \cdot 10^2$


Р и с. II.14. ИК-спектры растворов метиламидов N-ацетил-L-аланина (I) и N-ацетил-L-валина (V) в CCl_4 (1) и CHCl_3 (2)

таты экспериментальной оценки, приведенные в табл. II.11, показывают, что доля свернутых форм варьирует в широких пределах в зависимости от растворителя, N-метилирования N-концевой амидной группы и типа аминокислоты. Во всех случаях при переходе от CCl_4 к CHCl_3 существенно растет содержание развернутых форм. Отмеченные наблюдения находятся в хорошем количественном согласии с результатами теоретического конформационного анализа тех же соединений.

В табл. II.12 приведены экспериментальные и теоретические значения дипольных моментов (μ) серии монопептидов и их N-метильных производных [88]. Дипольные моменты измерены в растворах CCl_4 и CHCl_3 ;

они представляют собой усредненные по всем конформациям молекул величины. Для суждения о зависимости значения μ от величин двугранных углов ϕ , ψ монопептидов была построена соответствующая карта, которая на рис. II.15 совмещена с потенциальной поверхностью метиламида N-ацетил-L-аланина. Дипольный момент всей молекулы определялся путем векторного сложения моментов амидных групп, которые, согласно данным Курланда и Вильсона, равны 3,7 D и направлены под углом 40° к пептидной связи $\text{C}'\text{--N}$ [1]. Из сопоставления экспериментальных данных с результатами расчета следует, что в конформационном равновесии соединений I-X в неполярном и слабополярном растворителях возможно

Таблица II 11

Содержание (%) свернутых форм метиламидов N-ацетил- α -аминокислот и их метильных производных в растворах CCl_4 и CHCl_3 *

Соединение	Растворитель		Соединение	Растворитель	
	CCl_4	CHCl_3		CCl_4	CHCl_3
Ac-L-Ala-NHMe	65	25	Ac-L-Pro-NHMe	90	55
Ac-L-MeAla-NHMe	75	40	Ac-Gly-NHMe	—	10
Ac-L-Val-NHMe	65	20	Ac-L-Phe-NHMe	70	30
Ac-L-MeVal-NHMe	70	30			

* Содержание свернутых форм определено с точностью $\pm 5\%$ при концентрациях $\sim 10^{-4}$ моль/л.

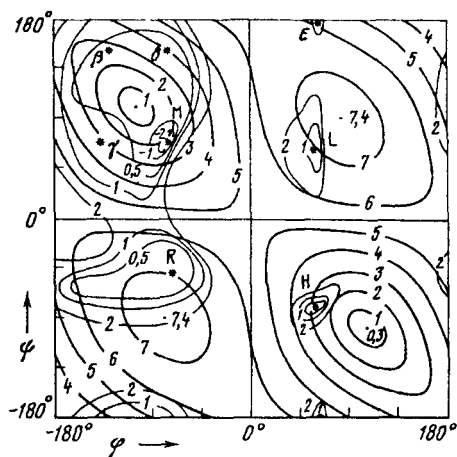


Рис. II.15. Карта дипольных моментов и конформационная карта метиламида N-ацетил-L-аланина (контуры даны соответственно в единицах D и ккал/моль)

Звездочками отмечены положения оптимальных конформаций

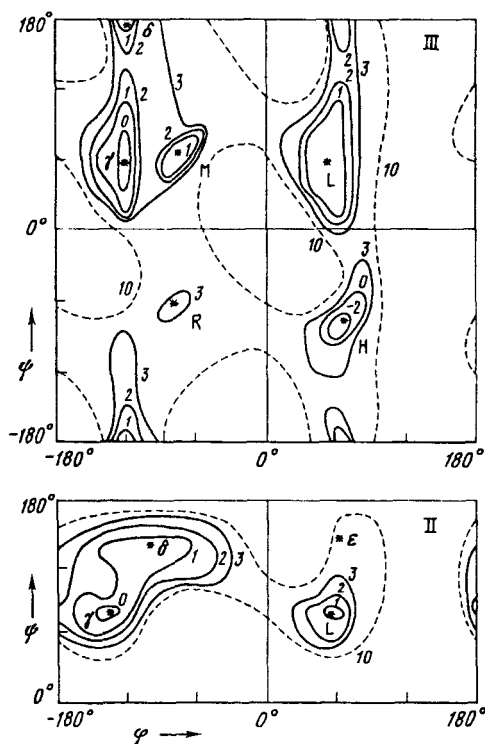


Рис. II.16. Конформационные карты метиламида N-ацетил-N-метил-L-аланина (III) и диметиламида N-ацетил-L-аланина (II), рассчитанные применительно к условиям неполярной среды

Звездочками отмечены положения оптимальных конформаций

**Дипольные моменты (μ , D) метиламидов N-ацетил- α -аминокислот
и их N-метильных производных**

Номер	Соединение	Опыт		Расчет							
		Раствори- тель		Оптимальная конформация							
		CCl ₄	CHCl ₃	R	L	γ	δ	ε	H	M	
I	Ac-L-Ala-NHMe	3,12	3,20	7,0	6,9	3,2	3,9	5,7	2,7	2,3	
II	Ac-L-Ala-NMe ₂	2,80	3,56	6,8	7,0	2,8	2,9	6,6			
III	Ac-L-MeAla-NHMe	2,85	2,92	7,2	6,8	3,2	3,8	5,6	2,8	2,5	
IV	Ac-L-MeAla-NMe ₂	2,90	2,93		6,8	2,9	3,1	3,8			
V	Ac-L-Val-NHMe	2,80	2,70	7,1	7,2	3,1	3,8		2,6	2,2	
VI	Ac-L-Val-NMe ₂	2,53	2,49	6,7	6,9	2,5	2,8				
VII	Ac-L-MeVal-NHMe	1,99	2,01		7,2	2,3	3,7		2,5	2,0	
VIII	Ac-L-MeVal-NMe ₂	2,57	2,62		7,1	2,5					
IX	Ac-L-Pro-NHMe	2,96	3,44	6,8			4,3			2,7	
X	Ac-L-Pro-NMe ₂	4,17	4,30	7,0			4,0				
				4,4*			7,0*				

* Дипольный момент при *цис*-конфигурации амидной группы; во всех других случаях приведены расчетные значения μ для конформации с *транс*-амидными группами.

лишь небольшое содержание форм R и L. Более корректно, однако, было бы сравнить опытные значения дипольных моментов с теоретическими, рассчитанными не для отдельных оптимальных конформаций, а в виде статистических сумм. С этой целью была использована формула $\mu = \sqrt{\mu^{-2}} = \sqrt{\sum_{\phi} \sum_{\psi} \mu_{\phi\psi}^2 g_{\phi\psi}} / \sum_{\phi} \sum_{\psi} g_{\phi\psi}$, где $\mu_{\phi\psi}$ – дипольный момент при данных ϕ, ψ (рис. II.15); $g_{\phi\psi}$ – статистический вес конформационного состояния ϕ, ψ , рассчитанного исходя из соответствующих карт ϕ – ψ . Теоретическое значение статистического дипольного момента в CHCl₃ оказалось равным 3,1 D в хорошем согласии с опытом (табл. II.12). В конформациях R и L дипольные моменты велики (~7,0 D), в B(γ, δ) – малы. Вклад в величину μ свернутых форм невелик, поскольку их содержание в разбавленном растворе CHCl₃ не превышает 25%, поэтому преобладающими являются конформации типа B, что полностью согласуется также со спектрами кругового дихроизма и дисперсии оптического вращения [88]. Значение статистического момента метиламида N-ацетил-L-аланина, рассчитанного аналогичным образом, оказалось равным 2,97 D, что также близко опытной величине и правильно передает тенденцию изменения момента при смене растворителя.

5.2. N-МЕТИЛЬНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ МЕТИЛАМИДОВ N-АЦЕТИЛ- α -АМИНОКИСЛОТ

Рассмотрение пространственного строения N-метильных производных метиламидов N-ацетил- α -аминокислот интересно прежде всего потому, что эти молекулы являются ближайшими аналогами монопептидов и, обладая значительно меньшей конформационной свободой, оказываются удобными объектами для проверки результатов теоретического анализа путем сравнения с более легко интерпретируемыми опытными данными физических методов [89]. Из сопоставления конформационных карт метиламидов N-ацетил-L-аланина (I, рис. II.10,б) и N-ацетил-N-метил-L-аланина (III, рис. II.16) видно, что метилирование аминокислотного остатка особенно резко ограничивает свободу вращения вокруг связи N-C α (φ) и тем самым сильно сужает области низкой энергии R и B.

В табл. II.13 приведены найденные при минимизации углы вращения φ , ψ и величины относительной энергии оптимальных форм. Самой выгодной у молекулы III становится конформация H с внутримолекулярной водородной связью (рис. II.16). О доминировании свернутой формы у этого соединения в инертной среде, как и в аналогичных условиях у метиламидов N-ацетил-N-метил-L-валина (VII) и L-пролина (IX), свидетельствуют (в полном согласии с расчетом) ИК-спектры (рис. II.17, табл. II.11). Другая свернутая конформация M хотя и образует у молекулы III водородную связь, но из-за стерических эффектов невыгодна; ее энергия на 3,6 ккал/моль больше энергии формы H. Из развернутых конформаций монопептида N-метил-L-аланина предпочтительными являются формы γ и L (см. рис. II.16 и табл. II.13). Конформации δ , ϵ и R маловероятны. Энергия последней на 2,9 ккал/моль выше L; у дезметильного монопептида (I) наблюдается обратная картина (см. табл. II.10). Таким образом, из конформационного анализа молекулы III следует, что в разбавленных растворах неполярных растворителей будет осуществляться равновесие в основном между двумя молекулярными формами

Таблица II.13

Геометрические параметры (град) и относительная энергия (ккал/моль)
оптимальных конформаций N-метильных производных N-ацетил-L-аланина

Конформация	Метиламид N-ацетил-N-метил-L-аланина			Диметиламид N-ацетил-L-аланина			Диметиламид N-ацетил-N-метил-L-аланина		
	φ	ψ	$U_{\text{общ}}$	φ	ψ	$U_{\text{общ}}$	φ	ψ	$U_{\text{общ}}$
	-126	58	0	-134	-74	0	-133	70	0
	50	58	0,7	48	74	0,9	44	68	1,5
	-118	172	1,0	-101	144	0,6	-92	145	2,9
	60	-179	1,5	65	148	3,3	64	148	3,9
	-79	-62	3,5	-66	-42	7,0	-	-	-
	61	-63	-2,4	-	-	-	-	-	-
	-76	64	1,2	-	-	-	-	-	-

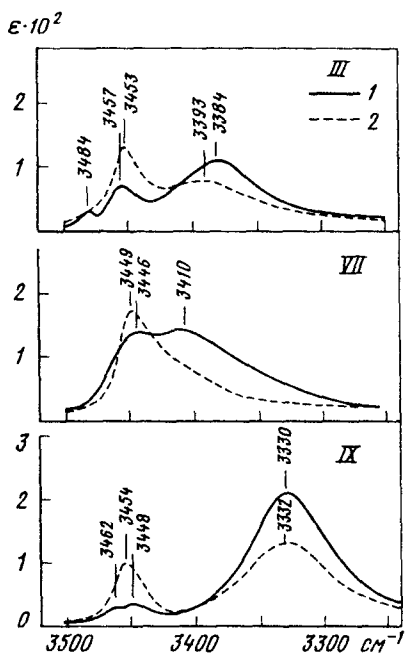


Рис. II.17. ИК-спектры метиламидов N-ацетил-N-метил-L-аланина (III), N-метил-L-валина (VII) и L-пролина (IX) в CCl_4 (1) и CHCl_3 (2)

(Н и γ). Наличие такого равновесия подтверждают, как уже отмечалось, данные ИК-спектров (см. рис. II.17). С. Мидзусимой и соавт. [90] с помощью спектров была оценена энергетическая разница между двумя указанными формами в $2 \pm \pm 0,3$ ккал/моль для метиламида N-ацетил-N-метилнорлейцина, стерического аналога соединения III в растворе CCl_4 . Наша теоретическая оценка величины ΔU в этих условиях составляет 2,4 ккал/моль. С увеличением полярности растворителя доля свернутой формы уменьшается (см. рис. II.17).

Результаты расчета диметиламида N-ацетил-L-аланина (II) приведены на рис. II.16 и в табл. II.13. Внутримолекулярную водородную связь соеди-

динение II образовать не может. Наиболее устойчивой развернутой формой в неполярной среде является γ, за ней с незначительной энергетической разницей следуют δ и L; конформации R и ε маловероятны. Замещение водорода на группу CH_3 при амидном азоте (II) значительно больше сужает области низкой энергии, чем в случае аналогичного замещения водорода у атома N аминокислотного остатка (III). Фактически запрещенными становятся все конформации со значениями угла ψ меньше 40° . Расчет предсказывает, что в полярных средах несколько более вероятной по сравнению с конформацией γ, доминирующей в инертной среде, будет реализация конформации L. Исследованные нами [88] дипольные моменты соединения II и близкого ему VI (см. табл. II.12) полностью согласуются с данными расчета [89]. Опытные величины дипольных моментов молекул II и VI в растворе CCl_4 (соответственно 2,80 и 1,99 D) совпадают со значениями, рассчитанными для формы γ (2,7 и 2,0 D). При переходе к слабополярному растворителю CHCl_3 наблюдается заметное увеличение дипольного момента у II, что указывает на естественное смещение конформационного равновесия к более полярным формам. Дипольный момент соединения VI, однако, остается здесь практически постоянным. Если это так, то соответствующие спектральные кривые КД и ДОВ соединений II и VI в неполярной среде, например в гептане, должны быть близки и отвечать конформации γ. Рис. II.18 свидетельствует, что это действительно имеет место. При переходе к водным растворам кривые КД и ДОВ соединения II резко меняются и, безусловно, отвечают уже иному конформационному состоянию. В воде доминирует.

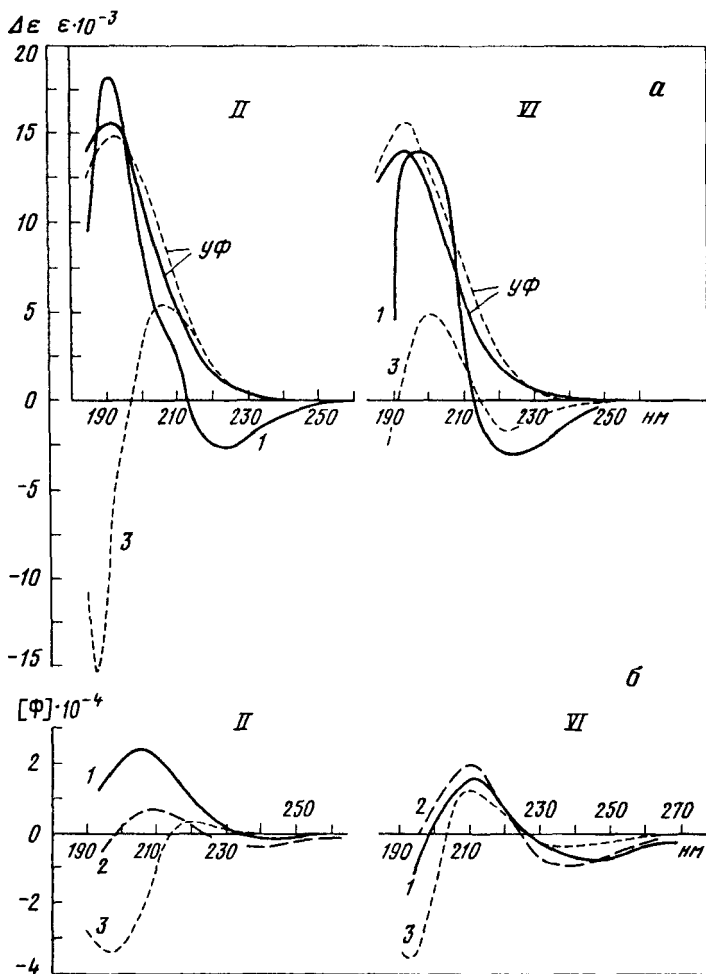
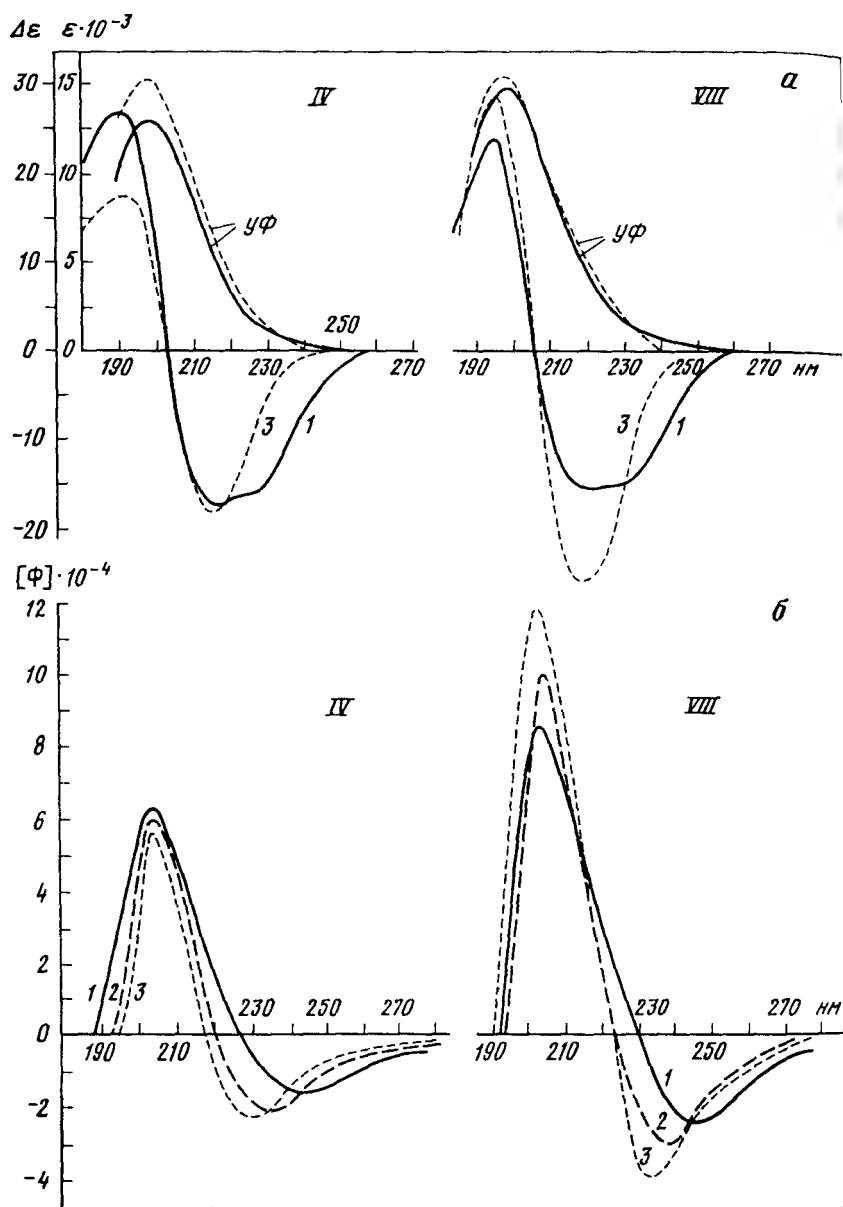


Рис. 11.18. УФ-спектры, кривые КД (а) и ДОВ (б) диметилами́дов N-ацетил-L-аланина (II) и N-ацетил-L-валина (VI) в гептане (1), этаноле (2) и воде (3)

Видимо, форма L, предсказанная в расчете [89] и удовлетворяющая данным спектров ЯМР [88] и дипольных моментов (см. табл. П.12). Кроме того, это подтверждается и тем обстоятельством, что кривая КД соединения II в воде аналогична кривой поли-β-метил-L-аспартата, образующего, согласно работам Д. Урри [91] и Г. Шераги с соавт. [92], левую спираль, а также весьма схожа с зеркальным отражением кривой правой спирали поли-L-аланина (данные Ф. Квадрифоглио и Д. Урри [93]). На кривой КД соединения II в гептане наблюдаются признаки дихроичного поглощения конформации L, а на кривой КД водного раствора II конформации γ. Это позволяет заключить, что содержание примесных форм невелико. Валиновое производное VI в гептане и этаноле



Р и с. II.19. УФ-спектры, кривые КД (а) и ДОВ (б) диметиламидов N-ацетил-N-метил-аланина (IV) и N-ацетил-N-метил-L-валина (VIII) в гептане (1), этаноле (2) и воде (3)

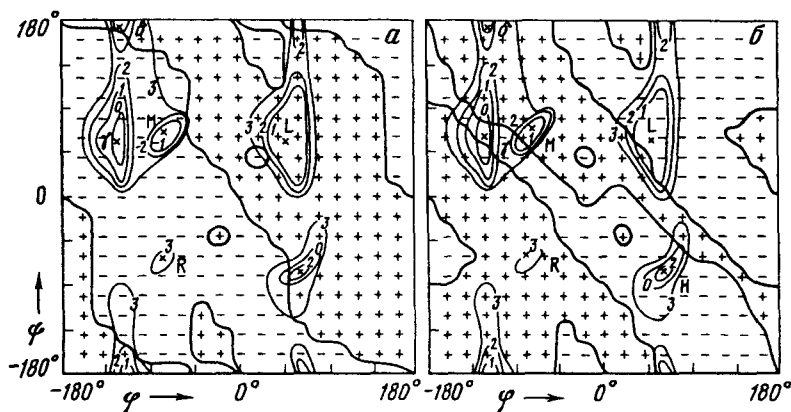


Рис. II.20. Карты вращательных сил метиламидов N-ацетил-N-метил-L-аланина (III), N-ацетил-N-метил-L-валина (VIII) и L-пролина (IX), совмещенные с конформационной картой молекулы III

а - $n-\pi^*$ -переход, б - $\pi-\pi^*$ -переход

(см. рис. II.18) практически полностью присутствует в конформации γ (что согласуется с постоянством дипольного момента VI в растворах CCl_4 и $CHCl_3$), и лишь в воде равновесие заметно смещается в сторону конформации L.

Потенциальная поверхность диметиламида N-ацетил-N-метил-L-аланина (IV) мало отличается от потенциальной поверхности только что рассмотренной молекулы (II). Конформационная карта IV фактически представляет собой результат совмещения карт II и III (рис. II.16). Энергия оптимальных конформаций молекулы IV и их геометрические параметры приведены в табл. II.13. Расчет приводит к заключению о реализации во всех средах практически только одной конформации γ . Соответствует ли это заключению экспериментальным данным? На кривых КД соединения IV, как и аналогичного N-метилзамещенного валинового диметиламида (VIII) в растворе гептана (рис. II.19) наблюдаются отрицательные полосы $n-\pi^*$ -переходов при 227 нм и по две полосы противоположного знака при 112 и 192 нм, характерные для $n-\pi^*$ -переходов. В водных растворах кривые КД лишь незначительно изменяют свою форму в основном в результате голубого сдвига полосы $n-\pi^*$ -перехода. Мало отличаются между собой и кривые ДОВ соединений IV и VIII в растворах гептана, этанола и воды. Таким образом, спектры КД и ДОВ указывают на идентичность пространственных форм IV и VIII, а также на сохранение конформационного состояния соединений в различных средах. Это полностью соответствует результатам теоретического конформационного анализа.

Согласие между расчетными и опытными данными идет, однако, еще дальше. Из карт вращательных сил метиламидов N-ацетил- α -амино-кислот, рассчитанных Дж. Шеллманом и соавт. [94], следует, что из четырех конформаций, отвечающих локальным минимумам потенциальной

энергии на полученных нами конформационных картах соединений IV и VIII, только одна конформация γ , имеющая минимальную энергию, соответствует экспериментальным спектрам КД, т.е. имеет отрицательные полосы $n\text{--}\pi^*$ -перехода и ближнего $\pi\text{--}\pi^*$ -перехода (рис. II.20). Следовательно, можно утверждать, что диметиламиды IV и VIII обладают конформацией γ , устойчивой как в полярных, так и в неполярных средах. Интересно отметить, что кривая КД поли-N-метил-L-аланина в растворе перфторэтанола, полученная М. Гудманом и М. Фридом [95], близка к кривой КД диметиламидов IV и VII.

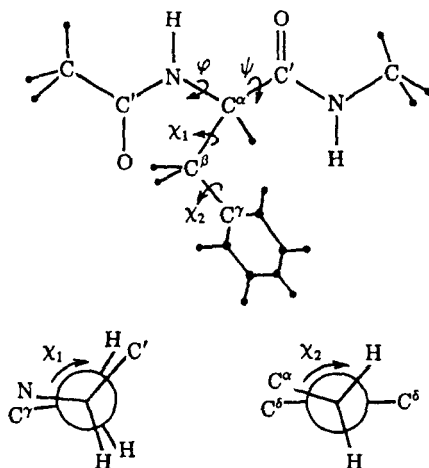
В отличие от соединений IV и VIII у диметиламида N-ацетил-L-пролина (X) фиксация угла ϕ при $\sim -60^\circ$ исключает реализацию формы γ . Результаты конформационного анализа этого соединения, полученные В. Медисоном и Дж. Шеллманом [96], Г. Шерагой и соавт. [97], Б. Пульманом и соавт. [98] и автором данной монографии и соавт. [88, 89] показали, что при *транс*-конфигурации амидной группы предпочтительной является конформация δ с параметрами $\phi \sim -60^\circ$, $\psi = 100\text{--}180^\circ$. Другая оптимальная форма R имеет резко очерченный потенциальный минимум, расположенный на 5–10 ккал/моль выше потенциального плато конформации δ . Наблюдаемый спектр КД соединения X в гептане не противоречит форме δ , имеющей, согласно карте вращательных сил, отрицательную полосу $n\text{--}\pi^*$ -перехода и более интенсивную положительную полосу $\pi\text{--}\pi^*$ -перехода.

Итак, были рассмотрены результаты теоретического конформационного анализа совместно с данными экспериментального исследования пространственного строения серии метиламидов N-ацетил- α -аминокислот и их N-метильных производных в различных средах. В основу интерпретации опытного материала были положены геометрические и энергетические характеристики ограниченного набора оптимальных конформаций монопептидов, изученных теоретически. При этом обнаружилось полное соответствие между всеми выводами теоретического анализа, с одной стороны, и экспериментальными данными, с другой. В результате была установлена непосредственная связь между оптимальными формами рассчитанных монопептидов и соответствующими опытными данными, полученными с помощью различных физических методов; теоретический и экспериментальный подходы не обнаружили противоречий в оценке тенденции смещения положений конформационного равновесия у изученных монопептидов при переходе от неполярных к полярным растворам. Тем самым было показано, что использованные в расчете потенциальные функции и параметризация адекватно отражают реальные взаимодействия атомов одного аминокислотного остатка и удовлетворительно имитируют влияние на эти ближайшие взаимодействия окружающей среды. Расчетный метод конформационного анализа выдержал, таким образом, свое первое испытание на пути к решению задачи структурной организации белков. Это, пожалуй, самый важный вывод из проведенного нами комплексного теоретического и экспериментального исследования. Он, конечно, не решал еще многих проблем, но послужил надежным обоснованием для следующего шага – анализа конформационных возможностей монопептидов всех остальных стандартных аминокислот.

5.3. БОКОВЫЕ ЦЕПИ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ

Рассмотрение пространственного строения метиламидов N-ацетил-глицина, L-аланина, L-валина, L-пролина и некоторых их N-метильных производных позволило получить представление о влиянии на конформационное состояние основной цепи объема заместителя при атоме C^α и замены атомной группы N-H на группу N-CH₃. Было выяснено, что изменение боковой цепи аминокислотного остатка и метилирование амидных групп заметно сказываются на конформационной свободе и стабильности оптимальных форм, но существенно не влияют на положение локальных минимумов и не ведут к образованию новых низкоэнергетических областей. Последнее заключение чрезвычайно важно, поскольку оно утверждает, что конформационные возможности основных цепей всех стандартных аминокислотных остатков в свободном состоянии описываются ограниченным набором одних и тех же оптимальных конформаций. Теперь, придя к такому заключению, можно обратиться к анализу и других аспектов ближних взаимодействий, а именно к выявлению оптимальных конформационных состояний боковых цепей и их взаимообусловленности с формой основных цепей собственных аминокислотных остатков. Это будет сделано на примере анализа результатов расчета пространственного строения двух молекул – метиламидов N-ацетил-L-фенилаланина и N-ацетил-L-глутаминовой кислоты. Поскольку нас теперь будут интересовать конформационные возможности свободных аминокислот только в водной среде, остановимся на рассмотрении расчетных данных, полученных при использовании параметризации потенциальных функций, отвечающей условиям полярного окружения [83].

Метиламид N-ацетил-L-фенилаланина. Пространственное строение молекулы определяется главным образом двумя углами вращения вокруг связей основной цепи – ϕ , ψ – и двумя углами вращения вокруг связей боковой цепи – χ_1 , χ_2 (рис. II.21). Для получения общего представления о потенциальной поверхности фенилаланинового монопептида, необходимого для определения положений локальных минимумов и выбора нулевых приближений для минимизации энергии, были построены конформационные карты при значениях углов χ_1 , χ_2 , соответствующих минимумам торсионных потенциалов вращения вокруг связей $C^\alpha-C^\beta$ и $C^\beta-C\gamma$ [99]. При расчете конформационной энергии учитывались невалентные электростатические и торсионные взаимодействия и водородные связи. Для нахождения конформаций, реализующихся в полярной среде, использованы значения диэлектрической проницаемости $\epsilon = 10$ и энергии пептидной водородной связи $D = 0,5$ ккал/моль. Были построены три семейства сечений потенциальной поверхности ϕ - ψ при $\chi_1 = 60, 180, -60^\circ$ и $\chi_2 = 30, 90, 150^\circ$ (положения при $\chi_2 = \pm 180^\circ$ изоэнергетичны). Если из всех сечений выбрать для каждой пары углов ϕ - ψ самое низкое значение энергии и занести его на новую карту, в итоге получится конформационная карта ϕ - ψ , в которой энергия в каждой точке будет грубо усреднена по углам χ_1 и χ_2 . Оказалось, что построенная таким образом карта ϕ - ψ метиламида N-ацетил-L-фенилаланина практически совпадает с картой ϕ - ψ метил-



Р и с. II.21. Модель молекулы метиламида N-ацетил-L-фенилаланина в конформации $\varphi = \psi = 180^\circ$, $\omega = 180^\circ$

Положения, отвечающие $\chi_1 = \chi_2 = 0^\circ$, показаны на проекциях Ньюмена

амида N-ацетил-L-аланина (рис. II.13). Следовательно, присутствие в молекуле объемной боковой цепи не сказывается на конформационной свободе основной цепи, что, однако, не исключает существования эффективной взаимосвязи между ними, и наличия корреляций между значениями конформационных параметров φ , ψ и χ_1 , χ_2 .

В отсутствие у фенилаланинового монопептида взаимодействий между основной и боковой цепями молекула должна была бы иметь 27 близких по энергии оптимальных конформаций (три состояния основной цепи и девять – боковой). Расчет, однако, показал, что лишь 16 из них имеют потенциальные ямы в пространстве φ , ψ и χ_1 , χ_2 . Проминимизированные значения их геометрических и энергетических характеристик приведены в табл. II.14. Оптимальные конформации молекулы не эквивалентны. Более предпочтительными являются формы В. В пределах комнатных значений kT им почти не уступают варианты типа R; наиболее высокоэнергетичны конформации L. Энергии однотипных по форме конформаций (R, B, L) основной цепи при $\chi_1 = 60, 180$ и -60° очень близки, т.е. все ротамеры с углами вращения вокруг связи $C^\alpha-C^\beta$, соответствующими минимумам потенциала $U_{\text{торс}}$, возможны для монопептида. Однако их изоэнергетичность еще не означает равновероятности.

Исследование потенциальной поверхности молекулы показало, что области низкой энергии R, B и L максимальны по своей площади при $\chi_1 = -60^\circ$ и минимальны при $\chi_1 = 60^\circ$. Следовательно, все состояния с $\chi_1 = 180$ и 60° при прочих равных условиях энтропийно менее выгодны состояний с $\chi_1 = -60^\circ$. Величины свободной энергии Гиббса ротамеров были оценены по формуле $G = RT \ln Z$, где: Z – статистическая сумма вероятностей состояния. Расчет показал, что в равновесной смеси при комнатной температуре содержание ротамеров с углами χ_1 , равными

Геометрические параметры (град) и относительная энергия оптимальных конформаций метиламида N-ацетил-L-фенилаланина

Форма основной цепи	Конформация				$U_{\text{общ}}$, ккал/моль
	φ	ψ	χ_1	χ_2	
R	-137	-60	-60	85	0,1
	-65	-50	-80	28	3,4
	-127	-59	-56	142	1,1
	-113	-60	176	87	0,3
	-100	-62	174	33	1,7
	-99	-33	64	87	0,4
B	-124	150	-61	89	0
	-113	145	-49	130	1,1
	-110	152	180	86	0
	-109	153	180	35	1,4
	-125	164	60	87	0
L	53	60	-58	90	1,3
	48	60	-54	150	2,8
	54	76	178	70	2,7
	50	76	178	30	3,1
	40	42	50	91	2,6

χ_1 -60, 180 и 60°, составит соответственно ~50, 30 и 20%. Что касается двугранного угла χ_2 , то наиболее выгодным его значением для всех форм основной цепи является ~90° (см. табл. II.14). Результаты расчета хорошо согласуются с опытными данными, полученными из спектров ЯМР производных фенилаланина С.Л. Портновой, В.Ф. Быстровым и соавт. [100]. Из спектров следует, что положение бензольного кольца соответствует углу $\chi_2 \sim 90^\circ$, угол вращения вокруг связи N-C α (φ) находится в области -140-100° и, наконец, популяции конформаций с $\chi_1 = -60, 180$ и 60° составляют 50-70, 15-30 и 5-20% соответственно. Приведенные в табл. II.14 данные получены путем минимизации энергии по четырем переменным ($\varphi, \psi, \chi_1, \chi_2$). Энергия этих конформаций была затем проминимизирована также при вариации валентных углов, у которых в центре находится атом C α . Перед обсуждением полученных результатов следует, однако, вернуться к расчету конформаций метиламидов N-ацетилглицина, L-аланина, L-валина и L-пролина [20, 67] и сказать несколько слов об анализе конформационной устойчивости валентных углов пептидных групп в углов при атоме C α .

Упомянутые углы в расчете этих молекул считались наряду с двугранными углами φ и ψ переменными. Детальный анализ показал, что размеры боковых цепей аминокислот и конформация основной цепи практически не влияют на валентные углы пептидных групп. Этот вывод хорошо согласуется с рентгеноструктурными данными о соединениях, со-

Валентные углы пептидной группы (град)

Угол	Расчетные значения угла N-метилацетамида	Среднее значение угла монопептидов (экспериментальное)	Параметры Полинга–Кори
$C^{\alpha}NC'$	123,7	123,8	123
$NC'O$	122,3	122,5	125
$NC'C^{\alpha}$	118,6	118,6	114
$C^{\alpha}NH$	115,9	115,7	114

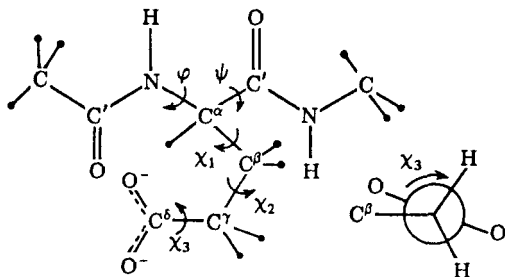
державших такие группы [101]. Расчет показал, что величина угла $NC^{\alpha}C'$, напротив, зависит от природы заместителя при атоме C^{α} и чувствительна к конформации основной цепи. С увеличением размера боковой цепи угол $NC^{\alpha}C'$ уменьшается с $111,8^{\circ}$ у Gly до $109,7^{\circ}$ у Ala и Pro и $105,9^{\circ}$ у Val. Такой характер изменения закономерен и является результатом отталкивания атомов основной и боковой цепей остатка, возрастающего с увеличением размера заместителя. Экспериментальные данные для различных аминокислот подтверждают результаты расчета. Так, в α -глицине угол $NC^{\alpha}C'$ равен $111,8^{\circ}$; в гидрате никелевой соли β -аланина – $109,6^{\circ}$; в солянокислом *L*-валине – 105° и в гидробромиде *L*-валина – 102° [102]. Зависимость углов при атоме C^{α} от конформации проявляется главным образом при переходе от форм R и B к L ($1-2^{\circ}$) и в еще большей степени к M и H ($2-4^{\circ}$).

В табл. II.15 даны теоретические значения валентных углов пептидной группы, усредненные по всем оптимальным конформациям трех монопептидов (Gly, Ala, Val). Средние значения практически полностью совпадают с рассчитанными нами валентными углами N-метилацетамида и в то же время несколько отличаются от известных параметров Полинга–Кори [40]. Последние, однако, не являются универсальными для пептидных соединений и, по существу, представляют собой экспериментальные значения, полученные Э. Хьюгэсом и В. Муром для β -глицилглицина [103]. Более поздний анализ дал иные значения углов. Например, Дж. Пиментел и О. Мак-Келлан [101] на основании многочисленных опытных данных получили среднее значение угла $NC'O$ в амидах 122° , что совпадает с нашим расчетным значением ($122,5^{\circ}$) и отличается от значения Л. Полинга и Р. Кори (125°). Для всех валентных углов при атоме C^{α} Полинг и Кори предлагают значение $109,5^{\circ}$. Эксперимент и наши расчеты противоречат такому предположению. Значения валентных углов при атоме C^{α} следует коррелировать по крайней мере с природой заместителя при C^{α} . В последующих расчетах для длин связей были использованы параметры Полинга–Кори, а для валентных углов пептидной группы – значения, приведенные в табл. II.15; углы при атоме C^{α} коррелировались с природой заместителя. Оставался неясным вопрос о зависимости этих углов от природы атомных групп при атоме C^{β} , который и решался конформационным анализом метиламида N-ацетил-*L*-фенилаланина.

Результаты расчета фенилаланинового монопептида при вариации

четырёх переменных φ , ψ , χ_1 , χ_2 и дополнительной вариации валентных углов при C^α оказались близкими. Различие в энергии оптимальных конформаций в обоих расчетах не превышало 0,3 ккал/моль и не изменяло порядка их расположения в энергетической шкале. Следовательно, при расчете конформаций пептидов для всех аминокислотных остатков, кроме Gly, Val, Ile и Pro, валентные углы можно принимать фиксированными при значениях, полученных из экспериментального и конформационного анализа метиламида N-ацетил-L-аланина [67].

Метиламид N-ацетил-L-глутаминовой кислоты. Конформационные возможности рассмотренных до сих пор молекул определялись главным обра-



Р и с. II.22. Модель молекулы метиламида N-ацетил-L-глутаминовой кислоты в конформации $\varphi = \psi = 180^\circ$, $\omega = 180^\circ$

Положение, отвечающее $\chi_3 = 0^\circ$, показано на проекции Ньюмена

зом дисперсионными взаимодействиями атомов и отчасти водородными связями. Углеводородные боковые цепи этих молекул не содержали значительных зарядов на атомах, и вклад электростатических взаимодействий в их структурную организацию был невелик, точнее, он определялся лишь контактами между пептидными группами, был всегда одним и тем же и не отражал специфики аминокислотного остатка. Примером монопептида, боковая цепь которого несет целочисленный заряд, является метиламид N-ацетил-L-глутаминовой кислоты (рис. II.22). В конформационном анализе молекулы [104] боковая цепь Glu предполагалась ионизированной с зарядами на атомах кислорода карбоксила, равными $-0,62$ эл. ед. Для диэлектрической проницаемости ϵ принята величина 10, которая дает наиболее удовлетворительную оценку электростатической составляющей конформационной энергии пептидов в водной среде [99]. Значение энергии водородной связи между N-H и карбоксилем боковой цепи Gln оценено в 0,9 ккал/моль.

Пространственное строение монопептида Ac-L-Glu-NHMe описывается пятью углами вращения φ , ψ , χ_1 , χ_2 и χ_3 . Поиск нулевых структурных вариантов для минимизации энергии проводился аналогично Ac-L-Phe-NHMe, т.е. путем построения сечений потенциальной поверхности φ - ψ при значениях углов боковой цепи, отвечающих минимумам торсионных потенциалов. Вращение вокруг связи C^γ - C^δ считалось свободным и сечения строились при $\chi_3 = 90^\circ$. В дальнейшем значение этого угла уточнялось

Геометрические параметры (град) и относительные величины общей энергии ($U_{\text{общ}}$), энергий ван-дер-ваальсовых ($U_{\text{вдв}}$) и электростатических ($U_{\text{эл}}$) взаимодействий между боковой и основной цепями в оптимальных конформациях метиламида N-ацетил-L-глутаминовой кислоты

Форма основной цепи	Конформация					Энергия ккал/моль		
	φ	ψ	χ_1	χ_2	χ_3	$U_{\text{вдв}}$	$U_{\text{эл}}$	$U_{\text{общ}}$
R	-100	-59	-58	-63	93	0	1,3	1,2
	-100	-60	-60	180	90	0,7	0,4	1,0
	-103	-57	-65	70	65	0	0	0
	-112	-57	-167	-65	113	0,4	1,7	2,6
	-98	-59	180	179	89	0,8	0,6	1,4
	-100	-60	178	62	92	0,4	1,7	2,0
	-160	-41	62	-60	100	-2,6	-1,1	1,0
	-81	-35	65	180	84	1,7	0,4	2,1
	-86	-10	61	69	60	2,8	1,1	4,6
B	-99	140	-60	-61	90	0,2	1,1	0,7
	-100	160	-61	-179	90	0,9	0,9	1,1
	-105	143	-57	64	51	0,6	0,8	1,0
	-125	130	-170	-69	118	0,9	1,3	1,5
	-101	138	-179	180	88	0,4	1,2	1,3
	-100	141	180	57	92	0,3	0,6	-0,4
	-150	154	62	-67	112	1,2	1,1	1,8
	-98	156	64	179	86	1,5	0,9	1,9
L	60	60	-60	-60	90	1,4	0,3	2,2
	60	60	-60	180	91	1,7	1,5	3,5
	57	77	-69	66	90	1,8	0,6	2,5
	43	94	-176	-90	110	3,2	3,0	8,1
	53	88	-176	173	88	1,9	1,8	4,3
	48	64	-170	68	72	2,1	0,8	3,6

для всех наиболее вероятных наборов углов φ , ψ , χ_1 , χ_2 . На основе сечений была получена обобщенная конформационная карта φ - ψ , которая, как и карта фенилаланинового монопептида, оказалась близкой карте φ - ψ метиламида N-ацетил-L-аланина, построенной применительно к условиям водного окружения. На потенциальных поверхностях трех монопептидов (Ala, Phe, Glu) отсутствовали минимумы, отвечающие свернутым формам основной цепи с внутримолекулярными водородными связями (Н и М).

Наиболее вероятные значения углов вращения вокруг связей $\text{C}^\alpha\text{--C}^\beta$ и $\text{C}^\beta\text{--C}^\gamma$ выяснены из сечений $\chi_1\text{--}\chi_2$ при фиксации углов φ , ψ в областях R, B и L. Для Ac-L-Glu-NHMe приемлемыми оказались все комбинации значений χ_1 , χ_2 , отвечающие минимумам торсионных потенциалов, за исключением $\chi_1 = \chi_2 = 60^\circ$. Сечения φ - ψ , $\chi_1\text{--}\chi_2$ и χ_3 позволили составить представление об ориентировочных значениях геометрических параметров всех возможных оптимальных конформаций молекулы Ac-L-Glu-NHMe. Они были уточнены минимизацией энергии при вариации углов вращения φ , ψ , χ_1 , χ_2 и χ_3 . Полученные результаты приведены в табл. II.16. Среди

конформаций типа R самая выгодная имеет углы $\chi_1 = -65^\circ$, $\chi_2 = 70^\circ$ и $\chi_3 = 65^\circ$, при которых один из атомов кислорода карбоксильной группы оказывается сближенным со связью N-H первой по цепи пептидной группы. Возможность образования водородной связи расширяет диапазон значений χ_3 , однако при этом не создается новой, более выгодной конформации. Формы монопептида с $\chi_1 \sim 60^\circ$ в области R менее реальны, чем с $\chi_1 \sim -60$ и 180° из-за сильных невалентных отталкиваний. В узком диапазоне значений угла ϕ (от -140 до -160°) возможно образование водородной связи при $\chi_1 \sim 60$, $\chi_2 \sim -60$ и $\chi_3 \sim 100^\circ$ (конформация с $U_{\text{общ}} = 1,0$ ккал/моль). Тем не менее это обстоятельство не ставит под сомнение вывод о малой предпочтительности форм R с $\chi_1 \sim 60^\circ$. В области B самой низкой энергией ($U_{\text{общ}} = -0,4$ ккал/моль) обладает конформация, в которой может реализоваться водородная связь между кислородом карбоксильной группы и водородом N-H группы второй по ходу цепи пептидной группы. Минимизация конформационной энергии без учета этой связи приводит практически к той же геометрии оптимальной конформации с относительной энергией $U_{\text{общ}} = 0,4$ ккал/моль. Следовательно, водородная связь не определяет данный локальный минимум, а только понижает энергию при выбранной нами параметризации на $0,8$ ккал/моль. В области L реальны конформации с $\chi_1 \sim -60^\circ$. Высокие значения $U_{\text{общ}}$ форм L (см. табл. II.16) обусловлены невалентными взаимодействиями и торсионным вкладом.

Из полученных данных об энергетике конформационных состояний метиламида N-ацетил-L-глутаминовой кислоты прежде всего следует отметить значительную стабильность форм R. Правда, по энергии электростатических взаимодействий в основной цепи все формы B по сравнению с R имеют преимущество в $\sim 0,6$ ккал/моль. Однако эта разница очень мала, и, кроме того, невалентные взаимодействия между основной и боковой цепями во многих конформациях области R перекрывают его и выводят форму R основной цепи на первое место. В α -спиральной структуре полипептидов дальние и ближние электростатические взаимодействия взаимно компенсируют друг друга, и поэтому преимущество формы R у остатка Glu становится более значительным. Вероятность существования C α в конформации L и способность образовывать левую α -спираль малы вследствие высокой энергии и низкой конформационной энтропии боковой цепи.

Подобным образом нами были изучены конформационные возможности монопептидов всех стандартных аминокислот, образующих белковые цепи. В каждом случае получена количественная оценка общей энергии и энергии отдельных составляющих ближних взаимодействий. Для всех монопептидов рассчитаны геометрические параметры оптимальных форм, составлены наборы наиболее предпочтительных по ближним взаимодействиям конформационных состояний и выяснена их устойчивость к природе строителя. Результаты теоретического и экспериментального изучения пространственного строения молекул свободных монопептидов приведены посредством соответствующих идентификаторов в табл. II 17. Теперь можно приступить к рассмотрению самого интригующего вопроса началь-

**Универсальные наборы конформационных состояний
стандартных аминокислотных остатков^{*1}**

Аминокислотный остаток	Конформационное состояние	Число конформационных состояний	Аминокислотный остаток	Конформационное состояние	Число конформационных состояний
Gly	См. рис. II.10, <i>a</i>	4	Cys	R ₁₁ , R ₁₂ , R ₁₃	
Ala	См. рис. II.10, <i>б</i>	3		R ₂₁ , R ₂₂ , R ₂₃	
Pro	См. рис. II.11	2		R ₃₁ , R ₃₂ , R ₃₃	
Phe	См. табл. II.14	12		B ₁₁ , B ₁₂ , B ₁₃	
Tyr	^{*2}	12		B ₂₁ , B ₂₂ , B ₂₃	
Trp	^{*3}	24		B ₃₁ , B ₃₂ , B ₃₃	
His	^{*3}	24		L ₂₂ , L ₂₃ , L ₃₃	
Val	R ₁ , R ₂ , R ₃	8	Ser ^{*5}	R ₁ , R ₂ , R ₃	9
	B ₁ , B ₂ , B ₃			B ₁ , B ₂ , B ₃	
	L ₂ , L ₃			L ₁ , L ₂ , L ₃	8
Ile	R ₁₁ , R ₁₂ , R ₁₃	20	Thr	R ₁ , R ₂ , R ₃	
	R ₂₁ , R ₂₂ , R ₂₃			B ₁ , B ₂ , B ₃	
	R ₃₂ , R ₃₃			L ₁ , L ₂ , L ₃	
	B ₁₁ , B ₁₂ , B ₁₃		Asp	R ₁₁ , R ₁₃ , R ₂₁	10
	B ₂₁ , B ₂₂ , B ₂₃			R ₃₁	
	B ₃₁ , B ₃₂ , B ₃₃			B ₁₁ , B ₂₁ , B ₃₁	
	L ₂₂ , L ₂₃ , L ₃₂			L ₁₁ , L ₂₂ , L ₂₃	
Leu	R ₁₁ , R ₁₂ , R ₁₃	22	Asn	R ₁₂ , R ₁₃ , R ₂₁	66
	R ₂₁ , R ₂₂ , R ₂₃			R ₂₃ , R ₃₁ , R ₃₂	
	R ₃₁ , R ₃₂ , R ₃₃			B ₁₁ , B ₁₃ , B ₂₁	
	B ₁₁ , B ₁₂ , B ₁₃			B ₂₃ , B ₃₁ , B ₃₃	
	B ₂₁ , B ₂₂ , B ₂₃			L ₁₁ , L ₂₃ , L ₂₃	
	B ₃₁ , B ₃₂ , B ₃₃			L ₃₃	
	L ₂₂ , L ₂₃ , L ₃₂		Glu	См. табл. II.16	20
	L ₃₃		Cln ^{*6}	R ₁₁ , R ₁₂ , R ₁₃	38
Met ^{*4}	R ₁₁ , R ₁₂ , R ₁₃	20		R ₂₁ , R ₂₂ , R ₂₃	
	R ₂₁ , R ₂₂ , R ₂₃			R ₃₁ , R ₃₂ , R ₃₃	
	R ₃₁ , R ₃₂ , R ₃₃			B ₁₁ , B ₁₂ , B ₁₃	
	B ₁₁ , B ₁₂ , B ₁₃			B ₂₁ , B ₂₂ , B ₂₃	
	B ₂₁ , B ₂₂ , B ₂₃			B ₃₁ , B ₃₂ , B ₃₃	
	B ₃₁ , B ₃₂ , B ₃₃			L ₂₂ , L ₂₃ , L ₃₃	
	L ₂₂ , L ₂₃ , L ₃₂				

^{*1} Конформационное состояние остатка определено идентификатором $X_{ij} \dots$, где X характеризует форму основной цепи остатка (R, B, L), а $i, j, \dots = 11, \dots, 12, \dots, 13, \dots, 21, \dots$ и т.д. отвечают положениям боковой цепи ($\chi_1, \chi_2, \dots$); индекс "1" соответствует углу χ в интервале $0 + 120^\circ$, "2" — $120 + -120^\circ$ и "3" — $120 + 0^\circ$.

^{*2} Как у Phe; угол χ_3 , (C^t-O) может принимать любые значения.

^{*3} Как у Phe, угол χ_2 при каждом значении угла χ_1 имеет два значения ($90, -90^\circ$), выродженных у Phe.

^{*4} Угол χ_3 ($C^\delta-S$) может принимать любое из трех значений: $60, 180, -60^\circ$.

^{*5} Угол χ_2 ($C^\beta-O^\gamma$) может принимать любые значения.

^{*6} Угол χ_3 имеет значение 90 и -90° . В остальных случаях углы χ_3 и χ_4 могут принимать любые из трех значений: $60, 180$ и -60° .

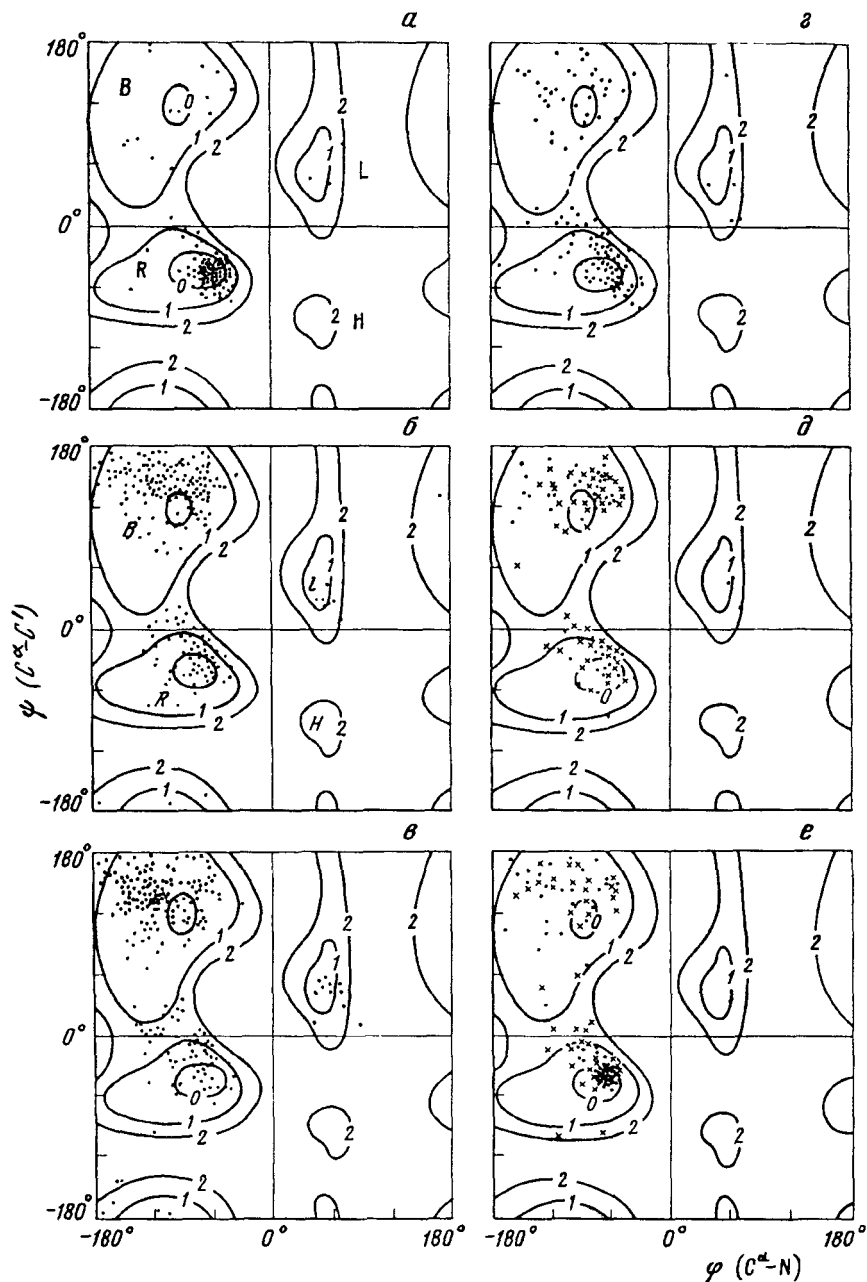
ного этапа структурных исследований белков. Какое отношение имеет изучение конформационных возможностей свободных монопептидов к структурной организации белковых молекул и что могут дать полученные нами результаты теоретического конформационного анализа стандартных аминокислотных остатков при решении этой задачи?

5.4. АМИНОКИСЛОТНЫЕ ОСТАТКИ В СВОБОДНОМ СОСТОЯНИИ И БЕЛКАХ

Ответ на поставленный вопрос требует сравнения ставших теперь известными оптимальных конформаций метиламидов N-ацетил- α -аминокислот с конформационными состояниями аминокислотных остатков в нативных трехмерных структурах белков. Первые определяются лишь ближними взаимодействиями, а вторые – суммарным эффектом ближних, средних и дальних взаимодействий. Сопоставление должно выявить меру воздействия ближних взаимодействий на реализующиеся в белках конформационные состояния и оценить роль этих взаимодействий в структурной организации макромолекул. В соответствии с одним из принципов постулированной в главе 2 теории [14, 105–107], утверждающим наличие согласованности всех видов внутримолекулярных невалентных взаимодействий, наблюдаемые в трехмерных структурах белков конформационные состояния остатков должны входить в набор низкоэнергетических оптимальных форм метиламидов N-ацетил- α -аминокислот. Только в этом случае предстанет принципиальная возможность сделать следующий шаг в сторону решения на основе рассматриваемого подхода проблемы структурной организации белков. Целесообразно рассмотреть в отдельности геометрию основных и боковых цепей аминокислотных остатков [108, 109].

Основные цепи. По характеру влияния формы боковой цепи (R) на конформационную свободу основной цепи монопептидного участка ($-\text{CONH}-\text{C}^\alpha\text{HR}-\text{CONH}-$) 20 стандартных аминокислотных остатков можно разделить на четыре стереохимических типа: Gly, Ala, Val и Pro. Первый и последний типы представлены только остатками Gly и Pro, третий – Val и Ile. Все остальные 16 остатков составляют тип Ala. Это означает, что их основные цепи имеют близкую конформационную свободу, совпадающую со свободой изолированного остатка Ala (см. рис. II.10,б и II.13). Гораздо сильнее отличаются потенциальные поверхности Gly и Pro; различия между поверхностями остатков типа Ala и Val сравнительно невелики, и в последующем изложении эти 18 остатков будут рассматриваться вместе.

На рис. II.23 представлена конформационная карта ϕ - ψ метиламида N-ацетил-L-аланина с нанесенными на нее конформационными точками (ϕ , ψ) всех остатков (за исключением Gly и Pro) миоглобина, изученного методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 1,5 Å, α -химотрипсина (2,0 Å), белка хрусталика глаза (1,9 Å), лизоцима (1,5 Å), нейротоксина II (1,8 Å), рубредоксина (1,2 Å), панкреатического трипсинового ингибитора (1,5 Å) и ферроцитохрома c (2,0 Å). Всего на карту нанесено 900 конформационных точек. Белки выбраны произвольно, требовалось

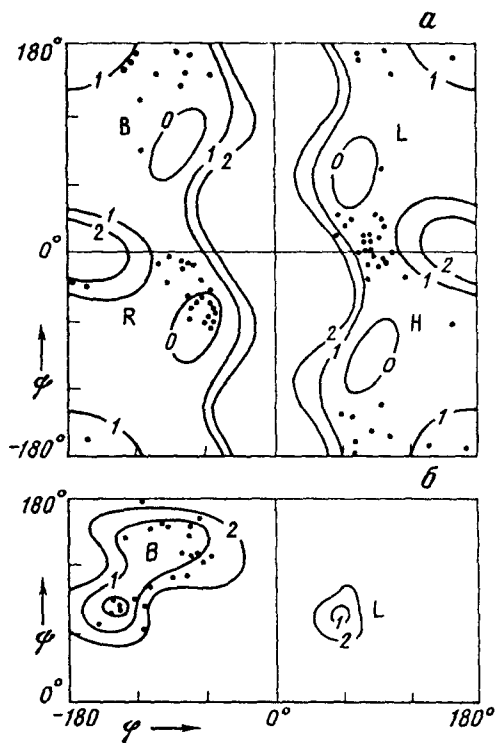


Р и с. П.23. Конформационная карта метиламида N-ацетил-L-аланина и конформационные точки аминокислотных остатков (за исключением Gly) в трехмерных структурах миоглобина (*a*), α -химотрипсина (*б*), белка хрусталика глаза (*в*), лизоцима (*г*), нейротоксина II (точки) и рубредоксина (крестики) (*д*), панкреатического трипсина ингибитора (точки) и ферроцитохрома с (крестики) (*е*)

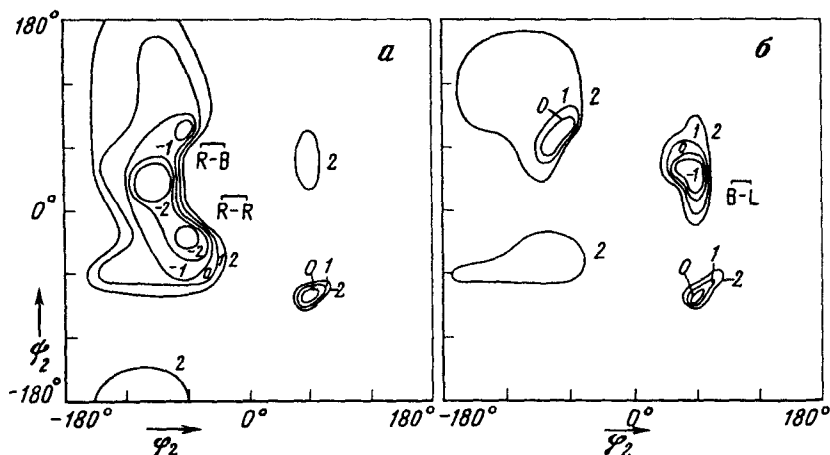
лишь, чтобы их кристаллические структуры были расшифрованы с хорошим разрешением. Конформационные карты метиламида N-ацетил-L-аланина, приведенные на рис. II.13 и II.23, несколько отличаются между собой. Карта на рис. II.23 построена с учетом только невалентных и торсионных взаимодействий, так как водородные связи $N-H...O=C$ типа $3 \rightarrow 1$ у монопептидов в водной среде слабы и практически не влияют на характер потенциальной поверхности; то же можно сказать и об электростатических взаимодействиях атомов основной цепи в условиях полярного окружения. Более существенным оказалось то обстоятельство, что контуры конформационной карты (см. рис. II.23) были получены при минимизации энергии по валентным углам. Это мало сказалось на эквипотенциальном сечении 1 ккал, однако привело к заметному смягчению потенциальной поверхности в области 2 ккал и особенно значительному в областях с большей энергией. Точки, соответствующие остаткам типа Ala и Val, занимают на карте аланинового монопептида главным образом низкоэнергетические области В и R; незначительное число точек (30) расположено в области L, и они отсутствуют (за одним исключением) в областях Н и М. Подавляющее большинство конформационных состояний остатков в белках попадают в области, окаймленные контуром в 1 ккал, а все остатки – в области, окаймленные контуром в 2 ккал. Если не считать точек в перешейке, соединяющем области В и R, о причине появления которых будет сказано ниже, то за пределами 1 ккал оказываются у миоглобина 2 точки, α -химотрипсина – 5, лизоцима – 8, нейротоксина II – 2, рубредоксина и трипсинового ингибитора – 0 и т.д. Остатки Val и Ile в соответствии с их более узкими, чем у остатков типа Ala, низкоэнергетическими областями потенциальной поверхности обнаруживают меньший разброс конформационных точек. В восьми рассмотренных белках около 90% всех остатков типа Ala и Val имеют энергию ближних взаимодействий валентно-несвязанных атомов < 1 ккал/моль и около 2% – < 2 ккал/моль. Приблизительно 8% конформационных точек сосредоточено на картах в районе потенциального барьера ($\sim 1,5$ ккал/моль), разделяющего области В и R.

Аналогичная ситуация в распределении конформационных точек на соответствующих картах монопептидов у остатков Gly и Pro. Как видно из рис. II.24,а, точки Gly тех же восьми белков разбросаны по всей карте. Тем не менее, энергия невалентных взаимодействий всех глициновых остатков (всего их 66) не превышает 2 ккал/моль, а 60 остатков – 1 ккал/моль. Конформационные точки Gly восьми белков сосредоточены (правда, неравномерно) вдоль вертикалей $\varphi \sim -80^\circ$ и $\psi \sim 80^\circ$. Именно в направлении этих линий вытянуты контуры низкой энергии на карте глицинового монопептида. Отличительной чертой распределения Gly является значительная концентрация точек в районе перевала, соединяющего области L и Н ($\psi \sim 0$). О причине этого явления скажу позднее.

Остановимся на некоторых закономерностях в распределении конформационных точек, отклоняющегося от чисто статистического, которые являются следствием невалентных взаимодействий ближайших звеньев. Более подробно этот вопрос будет рассмотрен в следующей главе. В конформационном анализе диметиламида N-ацетил-L-аланина (II) было



Р и с. II.24. Конформационная карта метиламида N-ацетилглицина (а), диметиламида N-ацетил-L-аланина (б) и конформационные точки Glu и других аминокислотных остатков, предшествующих Pro в трехмерных структурах миоглобина, α-химотрипсина, белка хрусталика глаза, лизоцима, нейротоксина II, рубредоксина, панкреатического трипсинового ингибитора и ферроцитохрома с



Р и с. II.25. Сечения потенциальной поверхности $\phi_2 - \psi_2$ метиламида N-ацетил-L-аланил-L-аланина при $\phi_1 = \psi_1 = -50^\circ$ (а) и $\phi_1 = 50^\circ$, $\psi_1 = 120^\circ$ (б)

показано, что конформационная свобода молекулы прежде всего ограничена областями В и L (см. рис. II.16). Разумно допустить, что потенциальная поверхность существенно не изменится при включении концевых атомов N молекулы II в пролиновое кольцо. Тогда наиболее вероятными конформациями остатков типа Ala и Val, предшествующих Pro, должны быть В и L. Действительно, из 27 совершенно различных по своей природе остатков, стоящих в цепи перед остатком пролина, 26 имеют форму основной цепи В и только один — R. На рис. II.24,б можно видеть, с какой удивительной точностью ложатся конформационные точки этих остатков в область низкой энергии диметиламида N-ацетил-L-аланина.

При рассмотрении конформаций аминокислотных остатков в белках было отмечено, что сравнительно большое число точек остатков типа Ala и Val сосредоточены на картах в районе потенциального барьера ($-1,5$ ккал/моль), разделяющего области В и R, а на глициновой карте также в области перевала между L и H. По-видимому, столь характерное, отличное от статистического, распределение имеет свои причины, близкие обсуждаемой теме. Для стабилизации таких состояний требуются небольшие взаимодействия, которые, однако, отсутствуют у монопептидов, но могут обнаружиться в более длинной цепи. Следовательно, можно видеть, как сильно влияет остаток Pro на конформационное состояние предшествующего остатка и как просто объясняется причина этого влияния.

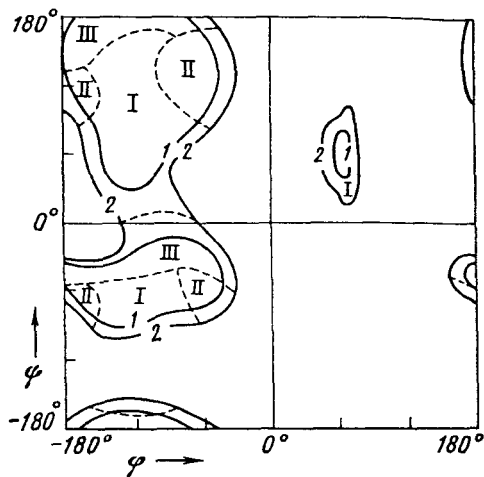
Из анализа конформаций дипептидов, в частности молекулы метиламида N-ацетил-L-аланил-L-аланина [110, 111], следует, что у целого ряда низкоэнергетических оптимальных форм с внутримолекулярной водородной связью типа $4 \rightarrow 1$, замыкающей десятичленный цикл, значения углов вращения вокруг связи $C^\alpha-C'$ второго остатка попадают в отмеченные промежуточные области (ниже или выше горизонтали $\psi = 0$). Более наглядную картину дают два сечения потенциальной поверхности дипептида Ac-L-Ala-L-Ala-NHMe, построенные с учетом водородных связей при $\phi = \psi = -50^\circ$ и $\phi = -50^\circ, \psi = 120^\circ$ (рис. II.25). На первом сечении контуры минимальной энергии расположены в области, разделяющей В и R на монопептидной карте, а контур 1 ккал/моль вытянут от $\phi = -40^\circ$ до $\phi = 40^\circ$, т.е. в том районе, куда попадают многие конформационные точки белков (рис. II.25). Не менее интересно и второе сечение. Отличие области L на нем от обычной монопептидной карты заключается в "понижении" ее энергетических контуров относительно ψ . Таким образом, причина сосредоточения конформационных точек белков на картах $\phi-\psi$ в областях, промежуточных между В и R и между L и H, заключается в том, что конформации соответствующих остатков стабилизируются водородными связями типа $4 \rightarrow 1$. Для компенсации небольшого проигрыша энергии невалентных взаимодействий в областях перешейков достаточна энергия водородной связи всего лишь около 1,0 ккал/моль. Как показал специальный анализ кристаллических структур [108], водородные связи типа $4 \rightarrow 1$, действительно, весьма широко представлены в белках. Например, в лизоциме имеются 15 дипептидных фрагментов с такой связью, а в α -химотрипсине — 24. Значения углов ϕ, ψ у второго остатка каждого из этих фрагментов находятся в области перешейка между В и R или в области перешейка между L и H.

Проведенный анализ пространственных форм основных цепей аминокислотных остатков в белках показал, что их конформационные состояния почти полностью определяются близкими взаимодействиями, т.е. взаимодействиями валентно-несвязанных атомов в пределах одного остатка. Влияние даже ближайших остатков ни в одном случае не ведет к повышению энергии, а проявляется лишь в характере распределения конформационных точек в пределах низкоэнергетических областей конформационных карт изолированных молекул метиламидов N-ацетил- α -аминокислот. Несмотря на наличие средних и дальних взаимодействий, которые обуславливают образование глобулы, в белках не реализуются состояния остатков с повышенной энергией близких взаимодействий. О высокой степени соответствия конформационных состояний самым низкоэнергетическим оптимальным конформациям свободных монопептидов свидетельствует, например, отсутствие в белках остатков в формах M и N, которые проигрывают в условиях водного окружения глобальным оптимальным конформациям не более 3,0 ккал/моль. Распределение конформационных точек ϕ , ψ остатков в белках на картах метиламидов N-ацетил- α -аминокислот находится в хорошем соответствии со свободной энергией состояний изолированных монопептидов.

Боковые цепи. Результаты предшествующего рассмотрения в определенной степени предопределяют и ответ на вопрос о соответствии конформационных состояний боковых цепей аминокислотных остатков в белках и свободных молекулах метиламидов N-ацетил- α -аминокислот. В самом деле, трудно представить наличие полного соответствия у основных цепей и отсутствие такового у боковых цепей. Тем не менее анализ конформационных состояний последних с точки зрения близких взаимодействий не лишен целесообразности. Для удобства рассмотрения боковые цепи аминокислот можно разделить на гидрофобные (неполярные) и гидрофильные (полярные). Конформации гидрофобных боковых цепей определяются прежде всего ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями, которые могут иметь как стабилизирующий, так и дестабилизирующий характер. В первом случае они называются дисперсионными, или лондоновскими, взаимодействиями. У монопептидов из-за небольшого числа атомов в молекулах энергия дисперсионных взаимодействий невелика, и поэтому их конформационные состояния определяются в основном мощными силами отталкивания. У полярных боковых цепей значительную роль могут играть также (но не исключительно!) электростатические взаимодействия и водородные связи. Среди боковых цепей гидрофобных остатков можно выделить цепи, имеющие разветвление при атоме C ^{β} (Val, Ile) и не имеющие такого разветвления. К последним относится группа аминокислотных остатков Phe, Tyr, Trp, His с ароматическими боковыми цепями. Изложенные в предшествующем разделе результаты теоретического конформационного анализа метиламида N-ацетил-L-фенилаланина (см. табл. II.14) свидетельствуют о том, что в этой молекуле пространственные формы основной и боковой цепей взаимосвязаны; каждой форме основной цепи соответствуют определенные энергетически выгодные положения заместителя. На рис. II.26 представлена конформационная карта ϕ - ψ фенилаланинового монопептида, разделенная пунктирными линиями на области.

Рис. П.26. Конформационная карта метиламида N-ацетил-L-фенилаланина, разделенная на области I, II и III, энергия которых минимальна для ротамеров с $\chi_1 = -60^\circ$, 180° и 60° соответственно

в которых энергия минимальна для одного из ротамеров с углами вращения $\chi_1 = -60^\circ$ (I), 180° (II) и 60° (III). Если на карту нанести белковые конформационные точки всех остатков типа Phe, как это было сделано в работе [109], то обнаружится, что в структурах белков в подавляющем большинстве случаев имеется точно такая же взаимосвязь конформационных состояний основной и боковой цепей, как у монопептидов.



Иными словами, в белках пространственная форма основной цепи остатка типа Phe в значительной мере предопределяет положение его боковой цепи. Обратное влияние проявляется в уменьшении значений углов ϕ основной цепи, что также следует из расчета монопептида. Распределение по углам $\chi_1 = -60^\circ$, 180° и 60° конформаций боковых цепей Phe и его стереохимических аналогов Tug, Tgr и His в белках составляет соответственно 56, 24 и 20% от их общего количества. Интересно, что согласно теоретической и экспериментальной оценкам приблизительно такие же веса трех ротамеров имеет свободная молекула метиламида N-ацетил-L-фенилаланина. Наиболее вероятной величиной угла вращения вокруг связи $C^\beta-C^\gamma$ χ_2 в монопептиде Phe является 90° (см. табл. П.14). Такое же значение χ_2 чаще всего имеют остатки типа Phe в белках. Например, в миоглобине из 23 остатков этого типа угол χ_2 , равный $\sim 90^\circ$, имеют 16 остатков, $\chi_2 \sim 150^\circ - 3$ и $\chi_2 \sim 30^\circ - 4$; в α -химотрипсине из 20 остатков угол $\chi_1 \sim 90^\circ$ имеют 16. Из шести остатков на неспиральных участках в обоих белках с иными чем $\sim 90^\circ$ значениями углов χ_2 в пяти остатках углы близки к 150° . Теоретически такое положение ароматических колец также возможно только при $\chi_1 = -60^\circ$. Действительно, во всех случаях, где $\chi_2 \sim 150^\circ$, угол χ_1 близок к -60° . На α -спиральных участках белков боковые цепи остатков типа Phe имеют углы $\chi_1 \sim -60^\circ$ и 180° ; угол $\chi_1 \sim 60^\circ$ в отношении ближних взаимодействий столь же вероятен, как и два отмеченных. Однако в α -спирали он не может реализоваться из-за наталкиваний, возникающих между ароматической группой и соседними боковыми цепями. Таким образом, в белках конформации всех остатков типа Phe близки к наиболее предпочтительным оптимальным конформациям метиламида N-ацетил-L-фенилаланина. Распределение углов вращения в боковых цепях соответствует свободным энергиям ротамеров монопептида Phe. Идентичность распределения конформаций

остатков Phe, Tyr, Trp и His подтверждает разумность их объединения в одну стереохимическую группу.

Конформационная специфика гидрофильных остатков не может быть полностью объяснена только невалентными взаимодействиями. Боковые цепи, содержащие группы $-\text{OH}$ (Ser, Thr), $-\text{COO}^-$ (Asp, Glu), $-\text{NH}_3^+$ (Lys) и т.д., в белках участвуют в образовании водородных связей с собственной основной цепью и с боковыми цепями других остатков, электростатических взаимодействий и солевых эффектов. В качестве примеров остатков с гидроксильной группой рассмотрим конформационные состояния в белках боковых цепей серина и треонина. Прежде всего оценим их конформационные возможности в свободном состоянии с точки зрения невалентных взаимодействий. Контактный радиус атома O ($1,5 \text{ \AA}$) лишь немного больше радиуса H ($1,2 \text{ \AA}$); кроме того, связь C—O ($1,43 \text{ \AA}$) длиннее связи C—H ($1,09 \text{ \AA}$). Поэтому группа $-\text{CH}_2\text{OH}$ в отношении невалентных взаимодействий с основной цепью близка к метильной группе, и конформационная свобода Ser практически не уступает Ala. Следовательно, все ротамеры относительно χ_1 (-60° , 180° , 60°) по невалентным взаимодействиям у Ser должны быть приблизительно равновероятны. У остатка Thr, подобно Val и Ile, разветвление в боковой цепи начинается у атома C $^\beta$. Поэтому у него, как и у остатков валина и изолейцина, наиболее вероятными должны быть те состояния, в которых атомы C $^\gamma$ и O $^\gamma$ не находятся между связями N—C $^\alpha$ и C $^\alpha$ —C $^\gamma$, что имеет место при $\chi_1 = 60^\circ$. В согласии с расчетом монопептида Thr боковые цепи этого остатка чаще всего встречаются в положении с $\chi_1 = 180^\circ$ (60%). Далее следует $\chi_1 = -60^\circ$ (30%) и $\chi_1 = 60^\circ$ (10%). Упомянутое стерическое ограничение отсутствует у серина, и в распределении конформаций у него по углу χ все три ротамера (-60° , 180° и 60°) представлены достаточно полно (соответственно 45, 25 и 30%). У остатков Ser и Thr, как известно, выражена тенденция избегать в белках внутренние витки α -спиралей. Гомополипептиды Ser и Thr не образуют α -спиралей, а существуют в форме β -структуры. В сополимерах с α -спиральными остатками они дестабилизируют, а при большом содержании разрушают α -спирали. Тем не менее на нерегулярных участках белков у Ser и Thr конформации R и B представлены с равными весами. Следовательно, отсутствие соответствующих α -спиральных полипептидов связано не с меньшей вероятностью нахождения остатков в конформации R, чем в B, а иными причинами, обусловленными кооперативным характером взаимодействий в α -спирали.

Причина дестабилизирующего влияния серина и треонина на α -спираль заключается в водородных связях, которые могут образовывать боковые цепи этих остатков с пептидными группами. Такая связь возможна у монопептидов Ser и Thr в конформациях R при соответственно $\chi_2 \sim 60^\circ$ и $\chi_2 \sim -60^\circ$. В α -спирали она конкурирует с водородной связью между группой N—H пятого остатка Ser (Thr) и группой C=O первого остатка, что, естественно, снижает устойчивость спирали. На спиральных участках белков, напротив, внутренняя водородная связь приводит к стабилизации данного состояния основной цепи в конформации R. В конформации B остатков Ser и Thr также возможна водородная связь O $^\gamma$ —H...O=C в пре-

делах монопептидного фрагмента. В β -структуре гидроксильная группа боковой цепи и карбонильная группа основной цепи оказываются сближенными при $\chi_1 \sim 180$ и 60° у Ser (60 и -60° у Thr). Образование такой связи в этом случае не препятствует водородному связыванию регулярных β -структурных участков параллельных или антипараллельных пептидных цепей, поскольку стерически не затрудняет подход двух протонов к карбонильному атому кислорода, способному служить их донором электронов. Участие группы OH в водородной связи при наличии пептидной водородной связи отчетливо проявляется в полученном З. Бауком и Э. Катчальским ИК-спектре кристаллического поли-L-серина, находящегося в β -структуре [112]. Следовательно, внутренняя водородная связь в остатках Ser и Thr в конформации R дестабилизирует α -спираль, а в конформации B стабилизирует β -структуру. Боковые цепи этих остатков могут образовывать разнообразные водородные связи. Однако важно подчеркнуть, что реализация таких возможностей в белках осуществляется при ориентациях боковых цепей Ser и Thr, соответствующих минимумам невалентных взаимодействий свободных молекул метиламидов N-ацетил-L-серина и -L-треонина.

Из анализа пространственного строения боковых цепей Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr и других аминокислотных остатков в белках [108, 109] следует вывод, который уже был сделан при рассмотрении пространственного строения основных цепей. В обоих случаях отчетливо видна корреляция между конформационными состояниями аминокислотных остатков в белках и оптимальными конформациями соответствующих метиламидов N-ацетил- α -аминокислот. Реализующиеся в белковых трехмерных структурах конформационные состояния остатков всегда отвечают наиболее выгодным конформациям свободных монопептидов. Средние и дальние взаимодействия ни при каких обстоятельствах не вступают в противоречие с требованиями, диктуемыми ближними взаимодействиями. Это подтверждает нашу теорию структурной организации белков (см. главу 2) в той ее части, которая касается согласованности между ближними взаимодействиями, с одной стороны, и средними и дальними взаимодействиями, с другой. Таким образом, для пространственных структур белков специфичной оказывается только последовательность конформационных состояний остатков, а не сами состояния. Основной принцип организации пространственной структуры белков, по существу, аналогичен принципу организации химической структуры. Различие в том, что в аминокислотной последовательности каждый стандартный остаток может быть представлен, как правило, только одной химической формой, а в трехмерной структуре — набором практически равновероятных пространственных форм (в среднем — 10). Если ближние взаимодействия валентно-несвязанных атомов решающим образом определяют конформационные возможности остатков, то на долю средних и дальних взаимодействий приходится выбор единственного для каждого остатка в белковой последовательности конформационного состояния из набора низкоэнергетических конформаций свободного монопептида соответствующей стандартной аминокислоты.

Таким образом, средние и дальние взаимодействия, создающие уникальную трехмерную структуру белка, могут проявлять себя только в

границах, установленных ближними взаимодействиями. В чем физические причины подобной субординации? В наборы низкоэнергетических конформаций свободных монопептидов, как уже отмечалось, входят все те пространственные формы молекул, в которых отсутствуют ван-дер-ваальсовы отталкивания. Энергия стабилизирующих взаимодействий валентно-несвязанных атомов здесь мала из-за небольшого числа контактов и слабости самих взаимодействий. Перспективными оказываются лишь формы, в которых отсутствует перекрывание ван-дер-ваальсовых атомных радиусов. По этой причине явились столь содержательными и интересными результаты работы Рамачандрана и соавт. [58]. Средние и дальние взаимодействия имеют стабилизирующий характер и включают дисперсионное притяжение, энергия которого при контакте двух атомов не превышает 0,1 ккал/моль, электростатические взаимодействия, сильно ослабленные в водной среде и обладающие малым градиентом (энергия отталкивания возрастает пропорционально r^{-12} , а электростатических взаимодействий — r^{-1}), и водородные связи, также слабые в этих условиях. Эффективность средних и дальних взаимодействий в стабилизации белковой глобулы в их массовости. Однако при установлении конформационных состояний аминокислотных остатков трудно ожидать с их стороны серьезной конкуренции с ближними взаимодействиями, т.е. с мощными силами невалентных отталкиваний. Только согласованность всех видов взаимодействий может сделать процесс структурной организации белка самопроизвольным, быстрым и безошибочным, особенно если учесть, что самосборка белковой молекулы протекает в динамически напряженных условиях при постоянном броуновском движении.

Наборы низкоэнергетических конформационных состояний, полученные нами для всех 20 стандартных аминокислотных остатков (см. табл. II.17), универсальны и могут быть использованы в анализе пространственного строения любой аминокислотной последовательности. По числу структурных вариантов они достаточно представительны, так как включают не только все конформационные состояния остатков, уже обнаруженные в кристаллических структурах белков, но и ряд других, потенциально возможных.

Глава 6

КОНФОРМАЦИИ МЕТИЛАМИДОВ N-АЦЕТИЛДИ- И ТРИПЕПТИДОВ

К принципиальным достижениям исследований конформационных возможностей свободных монопептидов можно отнести следующие. Во-первых, выполнен теоретический конформационный анализ всех стандартных аминокислотных остатков и для каждого из них получен полный набор оптимальных конформационных состояний. Во-вторых, с помощью целого комплекса физико-химических методов изучено пространственное строение

большого числа монопептидов и обнаружено полное соответствие результатов теории и эксперимента. В-третьих, оптимальные конформации свободных монопептидов сопоставлены с геометрией аминокислотных остатков в кристаллографических структурах белков и выявлена четкая корреляция между ближними взаимодействиями, с одной стороны, и средними и дальними, с другой. Реализующиеся в белковых молекулах конформационные состояния остатков всегда отвечают энергетически предпочтительным конформациям свободных монопептидов. Итогом конформационного анализа свободных монопептидов явилось получение универсальных наборов тех конформационных состояний стандартных аминокислотных остатков, которые только и могут встретиться в трехмерных структурах белков.

Для того чтобы наглядно представить себе все, что удалось выяснить о структурной организации белков на первом этапе, т.е. при изучении ближних взаимодействий, воспользуемся строительной аналогией, не претендующей на значительную глубину. В результате проведенных исследований стали известны все конформационные "кирпичики", из которых складываются пространственные структуры любых белков. Их оказалось очень много, и каждый из них имеет довольно сложный профиль потенциальной поверхности. Формы кирпичиков прежде всего зависят от их содержания, т.е. от природы аминокислот. Поэтому они подразделяются на 20 типов. Каждый тип, в свою очередь, состоит из ряда разновидностей, определяемых конформационными состояниями основной и боковой цепей и их взаимной ориентацией. Набор кирпичиков одного типа, по существу, представляет собой все возможные сочетания R-, B- и L-форм основной цепи (у Glu также H) и ротамеров боковой цепи с углами внутреннего вращения, отвечающими минимумам торсионных потенциалов. Исключениями являются лишь те сочетания, при которых имеет место перекрывание ван-дер-ваальсовых радиусов атомов.

Следующий шаг программы достаточно очевиден. Он должен состоять в разработке правил сооружения более сложных конструкций из ставших известными строительных элементов — оптимальных конформаций свободных монопептидов. Исходными здесь являются знания аминокислотной последовательности и всех возможных оптимальных конформаций остатков. Кроме того, будем руководствоваться нашей априорной идеей — количественной теорией структурной организации белков, поскольку она открывает путь к дальнейшему продвижению и получению результатов, проверяемых экспериментально. Поэтому в конечном счете она или приобретает статус физической теории, или окажется несостоятельной. Пока же поверим теории и будем считать, что для белковых пространственных структур характерна согласованность всех видов взаимодействий. В этом постулате не содержится ничего необычного или специфичного только для белков. Кристаллы всех веществ, получаемые при самопроизвольном процессе, обладают таким же свойством.

В чем же специфика белковой трехмерной структуры? Быть может, в плотной упаковке? На первый взгляд тоже нет. Любой процесс кристаллизации есть не что иное, как сближение атомов, ионов или молекул расстояния, обеспечивающие образование между ними дисперсионных

контактов, ионных пар, водородных связей и т.д. Поэтому всякий кристалл настолько плотно упакован, насколько комплементарны друг другу профили потенциальной поверхности образующих его атомов, ионов или молекул. Известно, что синтетические полимеры, в том числе полипептиды, не образуют монокристаллов и лишь после специальной обработки обладают текстурой. Природные гетерогенные аминокислотные последовательности самопроизвольно свертываются в плотно упакованные, всегда одни и те же при сохранении порядка аминокислот структуры ("аперриодические кристаллы"), которые могут взаимодействовать между собой, создавать монокристаллы или более сложные образования.

Следовательно, наличие в белковой глобуле согласованности всех видов невалентных взаимодействий в условиях компактной, плотной упакованной структуры, т.е. при максимальной насыщенности стабилизирующих внутримолекулярных взаимодействий, является исключительным свойством белков как гетерогенных полимерных макромолекул; обычно этим свойством наделены кристаллы только низкомолекулярных соединений. У белков оно было выработано в процессе эволюции путем вариации состава и порядка аминокислот. Дошедшие до нас последовательности белков свертываются в физиологических условиях таким образом, что в конечном счете все остатки приобретают те конформации из присущих им наборов низкоэнергетических форм, которые в глобуле оказываются наиболее комплементарными друг другу. Благодаря этому происходит резкая энергетическая дифференциация конформационных состояний, практически равноценных для свободных монопептидов, и выделение из огромного количества структурных вариантов уникальной нативной конформации белковой молекулы.

Любую природную аминокислотную последовательность можно сравнить с вполне определенным и специально отобранным как по ассортименту, так и по количеству набором деталей, необходимых для сборки устойчивого, целенаправленно и безошибочно работающего механизма. Искусственные гомо- и гетерополипептиды представляются в этом случае наборами совершенно одинаковых, произвольным образом набранных деталей. Из таких наборов, естественно, нельзя создать достаточно стабильную сложную структуру, наделенную определенной функцией, но в то же время можно собрать бесчисленное множество случайных конструкций.

Предположение о согласованности взаимодействий дает возможность последовательно рассмотреть сначала средние взаимодействия, а затем дальние. Плотная упаковка аминокислотных остатков в белковой глобуле (это уже не предположение, а констатация опытного факта) позволяет не включать в конформационный анализ белка молекулы окружающей среды, а учитывать скорректированные соответствующим образом только внутрибелковые взаимодействия. Итак, ближайшей задачей становится изучение средних взаимодействий, или, иначе, конформационный анализ олигопептидов. Под средними будут подразумеваться взаимодействия i -го остатка с четырьмя предшествующими ($i - 4$) – ($i - 1$) и четырьмя последующими ($i + 1$) – ($i + 4$) остатками в цепи (см. рис. 1.1). Следовательно, для учета средних взаимодействий одного остатка с его соседями в по-

следовательности требуется конформационный анализ нонапептидного фрагмента. Конечно, такой выбор не в полной мере строг. Он продиктован, в частности, тем обстоятельством, что именно на нонапептидном участке обнаруживаются эффективные взаимодействия между противостоящими в α -спирали i -м остатком и $(i - 4)$ -м и $(i + 4)$ -м остатками. Поскольку α -спираль в отношении основной цепи является одной из самых компактных пептидных структур, то можно полагать, что в других случаях нонапептидный фрагмент также окажется достаточным для учета взаимодействия центрального остатка со своими соседями. Например, у самой вытянутой структуры — β -складчатого листа средние взаимодействия реализуются на пентапептидном участке.

Выбор длины пептидной цепи, где проявляются средние взаимодействия, в принципе не столь уж важен. Несравненно более существенно то, что и в случае нонапептида мы не готовы к решению конформационных задач. Те средства, которые были использованы в анализе свободных монопептидов, здесь не годятся. Чтобы убедиться в этом, достаточно взглянуть на табл. II.17. Из нее следует, что в среднем аминокислотный остаток обладает ~20 равноценными низкоэнергетическими формами, учет которых необходим. Это практически исключает решение конформационной задачи не только нонапептида, но в большинстве случаев и пентапептида с использованием данных по монопептидам. Таким образом, возникает необходимость в разработке нового метода конформационного анализа, учитывающего особенности стерических взаимоотношений между соседними по цепи остатками. Можно было надеяться, что знание конформационной специфики пептидов позволит не рассматривать сочетания всех возможных низкоэнергетических конформационных состояний остатков (у пентапептида их в среднем более 10^6 , а у нонапептида — 10^{11}) и сделает расчет более реальным.

Практический интерес для разработки метода конформационного анализа пептидов может представить сопоставление результатов независимого конформационного анализа специальных серий молекул дипептидов $(i - 1, i)$ и $(i, i + 1)$ и трипептида $(i - 1, i, i + 1)$, полученных на основе данных по монопептидам $(i - 1)$, (i) и $(i + 1)$, с результатами априорного предсказания набора структурных вариантов трипептида $(i - 1, i, i + 1)$, содержащего все его низкоэнергетические конформационные состояния, полученных на основе известных конформационных состояний двух смежных дипептидов $(i - 1, i)$ и $(i, i + 1)$. Такое сопоставление могло открыть путь к выяснению конформационной специфики пептидов, послужить основанием для фрагментарного подхода и привести к созданию соответствующего метода конформационного анализа при соблюдении следующих условий. Во-первых, в том случае, если взаимодействия двух смежных остатков приводят к заметной дифференциации оптимальных форм каждого из них, так как не все сочетания самых выгодных конформаций свободных монопептидов приводят к выгодным конформациям пептидов. Во-вторых, если наиболее предпочтительные конформации дипептида представляют собой комбинации из ограниченного набора предпочтительных конформаций соответствующих дипептидов. Выполнение этого условия означает, что взаимодействия между непосредственно

связанными остатками ($i - 1$ и i ; i и $i + 1$) оказывают на конформационные возможности трипептида более существенное влияние, чем взаимодействия между крайними остатками ($i - 1$ и $i + 1$), и/или последние не вступают в противоречие с первыми и могут осуществляться при сочетании некоторых выгодных дипептидных конформаций. Наконец, непременным условием является достаточно четкое и, естественно, адекватное реальной ситуации обнаружение существующими потенциальными функциями энергетической дифференциации конформационных состояний пептидов.

6.1. МЕТИЛАМИДЫ N-АЦЕТИЛДИПЕПТИДОВ

Рассмотрение пространственного строения пептидов и метода их конформационного анализа начнем с изучения всех возможных конформаций у простейших молекул этих соединений, а именно: Ac-Gly-Gly-NHMe (I), Ac-L-Ala-L-Ala-NHMe (II) и Ac-L-Val-L-Val-NHMe (III) [110, 111]. Можно полагать, что молекулы с выбранными аминокислотными остатками достаточно полно отражают конформационные возможности основных цепей дипептидов с любыми боковыми цепями стандартных аминокислот. Между тем конформационные задачи этих молекул наиболее просты, поскольку фактически сводятся к установлению оптимальных форм только основных цепей. В качестве переменных были выбраны углы вращения φ_1 , ψ_1 , φ_2 , ψ_2 ; углы χ_1 и χ_2 у молекул II и III отвечали минимумам торсионных потенциалов и имели возможность изменяться при минимизации энергии (рис. II.27).

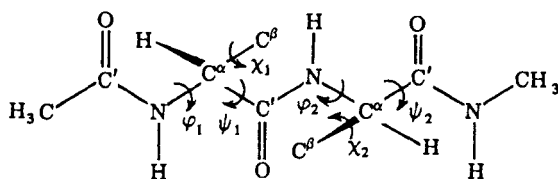
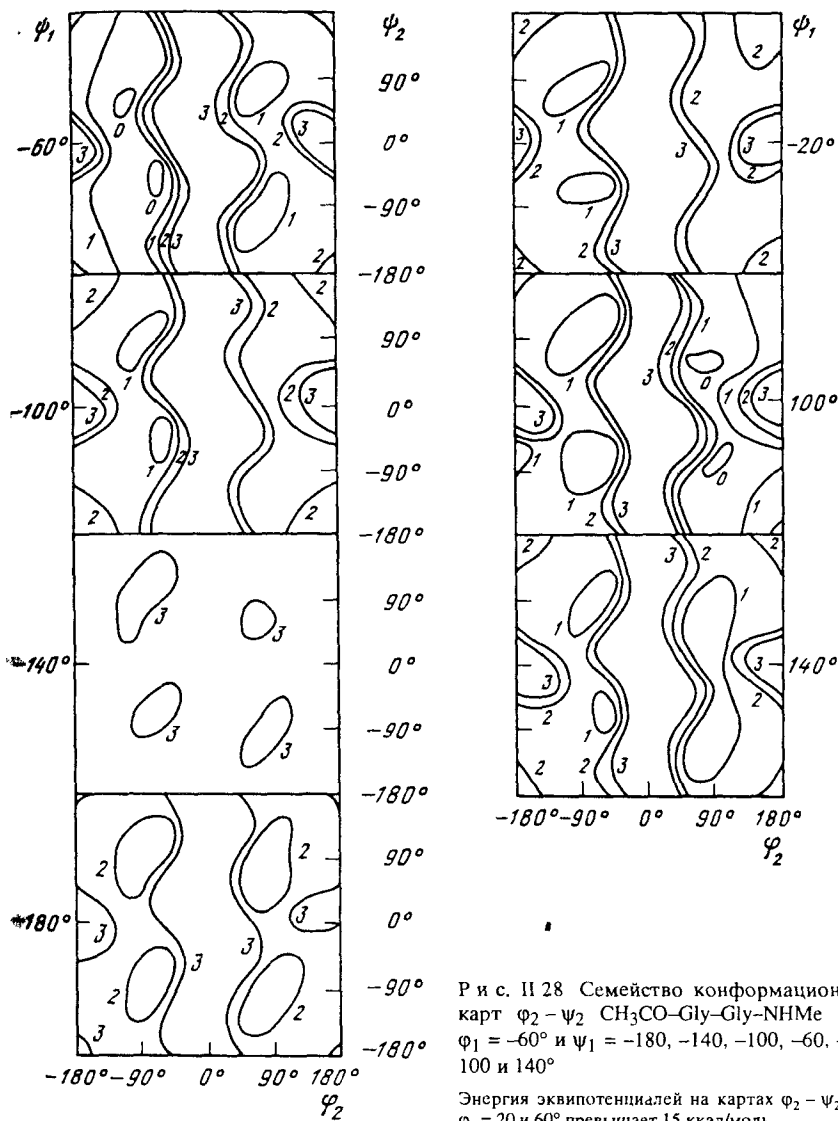


Рис. II.27. Модель молекул Ac-X-NHMe ($X = \text{Gly, Ala или Val}$) в конформации $\varphi_1 = \psi_1 = \varphi_2 = \psi_2 = 180^\circ$, $\omega = 180^\circ$

Для суждения о потенциальной поверхности молекул I-III в четырехмерном базисе (φ_1 , ψ_1 , φ_2 , ψ_2) были построены семейства конформационных карт φ_2 - ψ_2 при различных значениях φ_1 , ψ_1 , подобные приведенным на рис. II.28. Они показали, что конформационная энергия дипептида при варьировании одной пары углов φ , ψ зависит от значений φ , ψ соседнего аминокислотного остатка. Эффект влияния возрастает в ряду: I, II, III. Однако, и это очень существенно, взаимодействия между смежными остатками не приводят к значительным отталкиваниям, и положения минимумов на потенциальных сечениях дипептидов I-III соответствуют комбинациям углов φ , ψ , близким к значениям оптимальных конформаций соответствующих монопептидов. Такой результат служит обоснованием подхода, в котором при расчете конформаций дипептидного фрагмента в



Р и с. 11.28 Семейство конформационных карт $\psi_2 - \psi_1$ $\text{CH}_3\text{CO-Gly-Gly-NHMe}$ при $\phi_1 = -60^\circ$ и $\psi_1 = -180, -140, -100, -60, -20, 100$ и 140°

Энергия эквипотенциалей на картах $\psi_2 - \psi_1$ при $\phi_1 = 20$ и 60° превышает 15 ккал/моль

в качестве нулевых приближений при поиске локальных минимумов следует брать комбинации углов оптимальных форм монопептидов (R, B, H). В связи с этим конформации молекул Ac-X-X-NHMe можно обозначать через R-R, R-B, B-R, R-L и т.д.

Очевидно, такой подход окажется полезным и может быть использован в конформационном анализе более длинных пептидных цепей в случае достаточной энергетической дифференциации форм сложного фрагмента, представляющих комбинации изоэнергетических состояний более простых фрагментов, т.е. при отклонении от аддитивности. В работах [110, 111]

Геометрические и энергетические параметры оптимальных конформаций
Ac-L-Phe-L-Phe-NHMe

Форма основной цепи	Угол вращения, град								U _{обп} , ккал/моль
	Φ_1	Ψ_1	χ_1^1	χ_2^1	Φ_2	Ψ_2	χ_1^2	χ_2^2	
R ₁ -R ₂	-60	-33	65	86	-88	-33	62	90	1,2
	-98	-35	65	90	-129	-61	174	86	3,0
	-77	-23	72	89	-55	-46	-64	83	1,8
	-120	-61	135	89	-107	-37	61	91	2,8
	-120	-67	172	83	-141	-61	179	85	3,4
	-86	-52	180	92	-86	-53	-53	91	1,9
	-92	-49	-64	87	-60	-37	65	93	4,7
	-125	-58	-62	89	-90	-57	179	44	5,8
	-139	-60	-59	89	-134	-60	-56	88	2,6
R ₁ -B ₂	-100	-24	64	87	-108	164	67	92	1,6
	-119	-34	43	96	-121	161	178	115	5,8
	-129	-22	53	94	-102	166	-63	82	1,7
	-113	-56	-177	92	-120	164	60	92	2,2
	-123	-63	175	84	-124	152	179	89	3,2
	-113	-45	-161	89	-111	150	-70	93	4,2
	-141	-62	-61	91	-134	166	57	93	2,8
	-137	-60	-59	91	-111	148	180	86	4,0
	-136	-59	-60	90	-124	150	-57	88	2,4
B ₁ -R ₂	-129	167	66	94	-103	-38	66	90	3,0
	-127	177	74	99	-110	-72	175	80	3,5
	-95	172	77	90	-133	-60	-59	78	2,7
	-95	110	178	88	-149	-47	55	98	2,3
	-109	149	174	90	-121	-60	178	86	1,8
	-98	154	176	87	-135	-58	-59	83	0
	-129	134	-60	89	-109	-37	63	90	4,2
	-121	122	-61	89	-118	-59	180	90	4,5
	-96	114	-60	89	-130	-59	-55	89	2,3
B ₁ -B ₂	-102	169	69	92	-123	160	63	90	3,3
	-130	168	67	92	-104	146	180	87	3,1
	-114	173	75	92	-139	95	-58	87	2,0
	-110	141	180	84	-121	160	64	92	1,8
	-105	143	174	91	-121	138	179	85	2,1
	-95	155	168	90	-135	140	-60	87	0,6
	-109	128	-62	87	-140	154	56	88	3,8
	-131	136	-59	91	-112	145	179	87	4,2
	-105	124	-62	96	-140	156	-54	88	2,5

показано, что это имеет место. Среди всех возможных форм пептидной цепи предпочтительными оказались состояния В-В, R-R, R-В и В-R. Отклонения от аддитивности в энергии у исследованных дипептидов в основном обусловлены взаимодействиями основных цепей остатков. По сравнению с дипептидами других аминокислот они должны быть минимальными, так как при наличии мощных и лабильных заместителей при атомах C^α дополнительно возникают более эффективные и избирательные взаимодействия боковых цепей между собой и с основными цепями. Сказанное можно проиллюстрировать данными о пространственном строении фенилаланинового дипептида, рассчитанного в работе автора данной монографии и соавт. [118].

Молекула $Ac-L-Phe-L-Phe-NHMe$, если учитывать только самые выгодные и практически эквивалентные R и В конформационные состояния монопептида $Ac-L-Phe-NHMe$ (см. табл. II.14), имеет 36 оптимальных форм. При независимости конформационных состояний остатков Phe величины энергий этих форм дипептида должны были бы попасть в интервал 0–0,8 ккал/моль. Полный конформационный анализ дипептида, выполненный при учете взаимодействий между остатками фенилаланина, показал, что в данный интервал попадают лишь две, а в интервале 0–2,0 ккал/моль – девять конформаций; общий разброс относительной энергии составил ~6,0 ккал/моль, причем энергия половины конформаций попала в область 3,0–6,0 ккал/моль (табл. II.18). Следует отметить, что глобальная оптимальная конформация $Ac-L-Phe-L-Phe-NHMe$ совпала с кристаллическими структурами стереохимически аналогичных молекул $CH_3XCO-L-Phe-L-Phe-OEt$ ($X = Cl, Br$), расшифрованных Ч. Уейем и Д. Догерти [114].

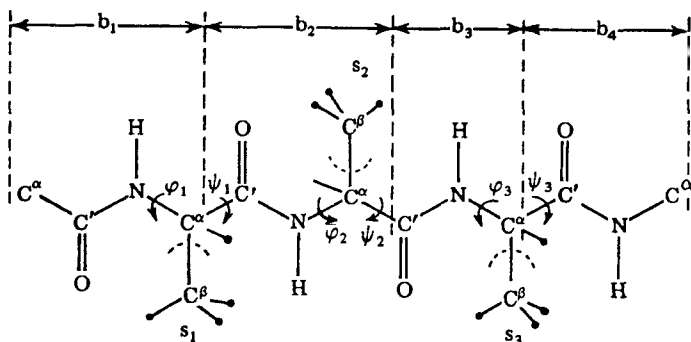
Таким образом, уже в первых исследованиях [110, 111, 113] было обнаружено, что даже в дипептидном фрагменте проявляется заметное детерминирование конформационных состояний. Предпочтительные конформации дипептида представляют собой комбинации низкоэнергетических форм монопептидов. Однако суть детерминирования заключается не только в этом, так как число таких комбинаций при удалении цепи также быстро растет и, следовательно, процесс энергетической дифференциации форм остается расходящимся. Выделение ограниченного набора реальных конформаций связано с отклонением от аддитивности, т.е. с взаимообусловленностью состояний соседних остатков. Предпочтительность одних структур определяется не только тем, что они сформированы из выгодных монопептидных конформационных состояний, но и дополнительной стабилизацией, возникающей при удлинении цепи лишь в некоторых конформациях. В равной мере конформации с высокой энергией неудовлетворительны не только вследствие энергетически менее выгодных составляющих их монопептидных форм, но, как правило, и из-за дополнительной дестабилизации.

6.2. МЕТИЛАМИДЫ N-АЦЕТИЛТРИПЕПТИДОВ

В предыдущем разделе рассмотрено решение конформационной задачи пептидов двумя способами – путем независимого исследования потенциальной поверхности молекул и через оптимальные формы соответ-

ствующих монопептидов. Показано, что оба способа приводят к совпадающим результатам, но второй значительно проще, поскольку поиск предпочтительных конформаций более сложной молекулы ведется только среди комбинаций выгодных форм более простых. Но это был лишь первый обнадеживающий результат, который было бы преждевременно обобщать на действительно сложные объекты. Он нуждался еще в обстоятельном анализе и дополнительном подтверждении.

В этом разделе рассматривается ряд аналогичных по своей направленности конформационных задач для ди- и трипептидов, решенных на основе прямого использования данных по монопептидам, с последующей оценкой



Р и с. II.29. Расчетная модель трипептида $C^{\alpha}CO-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NHC^{\alpha}$

возможности априорного предсказания исходных для минимизации структурных вариантов трипептидов с помощью ограниченных наборов выгодных состояний двух смежных дипептидов [115]. Для выяснения характера взаимодействий атомов основной цепи начнем обсуждение с аланинового трипептида, расчетная модель которого показана на рис. II.29.

Аланиновый трипептид. В исходных для минимизации приближениях геометрия каждого остатка аланинового трипептида соответствовала одной из оптимальных форм R, В или L молекулы $Ac-L-Ala-NHMe$ (табл. II.19). В табл. II.20 представлены результаты минимизации всех 27 возможных конформаций. В зависимости от характера формы основной цепи они подразделяются на три группы. О формах пептидной цепи и их классификации подробно будет рассказано в следующей главе. Сейчас лишь отметим, что конформации любого трипептидного участка по форме основной цепи могут быть разделены на свернутые, развернутые и полусвернутые. Группу со свернутой формой составляют конформации, в которых звено b_1 сближено с b_3 и b_4 , а b_2 — с b_4 (рис. II.29); они являются комбинациями свернутых форм смежных дипептидов R-R, R-B, B-L и др (табл. II.21). Развернутые формы трипептида образованы из развернутых дипептидных форм B-B, B-R, R-L и др. В группу полусвернутых форм входят конформации, которые являются комбинациями свернутых и развернутых дипептидных форм. Целесообразность такого разделения, как будет показано позже, обусловлена наличием у конформаций каждой группы специфических средних взаимодействий.

**Геометрические и энергетические параметры оптимальных
конформаций молекулы Ac-L-Ala-NHMe**

Форма основной цепи	Угол вращения, град		$U_{\text{общ}}$, ккал/моль
	φ	ψ	
B	-115	140	0
R	-90	-54	0,3
L	52	60	1,4

Самыми выгодными конформациями аланинового трипептида являются R-R-R и R-R-B (табл. II.20). Сближенность всех звеньев основной цепи приводит к возникновению дисперсионных взаимодействий между b_1 и b_3 , b_2 и b_4 , b_1 и b_4 , энергия которых составляет около -4,0 ккал/моль. Такие же дисперсионные взаимодействия характерны и для других конформаций этой группы - R-B-L, B-L-L, L-L-L. Меньшая предпочтительность последних связана с невыгодными в форме L близкими взаимодействиями. Дисперсионные взаимодействия в основной цепи имеют место и в конформациях группы полусвернутых форм (от -2,0 до -3,0 ккал/моль). Однако в отличие от предшествующей группы они осуществляются в пределах одного из дипептидных фрагментов. Полностью вытянутые конформации аланинового трипептида имеют максимальную энергию. Так, B-B-B и B-B-R проигрывают R-R-R и R-R-B ~2 ккал/моль. Это происходит из-за отсутствия дополнительных стабилизирующих взаимодействий между звеньями основной цепи. Конформационная энергия здесь складывается практически аддитивно из энергий ближних взаимодействий.

Сравним конформационные состояния остатков Ala в дипептидных и трипептидных фрагментах (см. табл. II.20 и II.21). Глобальные конформации трипептида R-R-R и R-R-B представляют собой комбинации наиболее выгодных форм дипептида - R-R и R-B, которые дополнительно, не ослабляя собственных взаимодействий, стабилизируются взаимодействиями между b_1 и b_4 . Свернутые конформации трипептида с большей энергией являются сочетаниями менее выгодных свернутых дипептидных форм. Аналогичная ситуация характерна и для конформаций трипептида двух других групп. Сопоставим теперь конформации рассчитанного свободного трипептидного фрагмента с геометрией основных цепей белковых фрагментов, включающих три остатка аланинового и валинового типов (все остатки, за исключением Gly и Pro). В табл. II.20 (крайняя правая колонка) приведены данные о частоте встреч той или иной конформации основной цепи у трипептидных фрагментов X-Y-Z в белках. Были использованы значения углов φ , ψ в кристаллических структурах миоглобина, изоцима, инсулина, α -химотрипсина, цитохрома с и карбоксипептидазы. Все наблюдаемые в белках формы основной цепи X-Y-Z соответствуют конформациям аланинового трипептида. Большинство фрагментов (98%), включающих самые разнообразные аминокислотные остатки, попадают в

**Геометрические и энергетические параметры оптимальных конформаций
фрагмента C^αCO-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NHC^α**

Форма основной цепи	Угол вращения, град						U _{общ} ккал/моль	Частота встреч конформаций трипептидных фрагментов в белках
	φ ₁	ψ ₁	φ ₂	ψ ₂	φ ₃	ψ ₃		
Свернутые формы основной цепи								
R-R-R	-68	-44	-60	-37	-65	-44	0	308
R-R-B	-55	-51	-78	-42	-103	-72	0	47
R-B-L	-78	-51	-82	93	52	58	1,5	4
B-L-L	-64	139	51	45	52	54	1,7	2
L-L-L	53	46	49	51	52	52	2,3	-
Полусвернутые формы основной цепи								
R-B-R	-57	-51	-100	51	-135	-59	0,4	34
B-R-R	-108	133	-55	-44	-80	-44	0,9	49
R-B-B	-56	-50	-102	66	-111	148	0,9	41
B-R-B	-108	148	-58	-46	-112	52	0,9	42
B-L-B	-66	119	51	42	-120	-60	1,0	1
B-L-R	-65	124	51	44	-112	146	1,3	8
L-L-R	53	46	48	51	-147	-61	2,1	-
B-B-L	-87	101	-66	103	53	45	2,3	6
R-R-L	-56	-48	-65	-42	52	48	2,4	4
L-L-B	53	45	60	54	-114	147	2,5	3
L-R-R	52	69	-52	-43	-81	-42	2,7	-
L-R-B	51	69	-54	-48	-107	57	2,8	2
R-L-L	-95	-50	50	55	54	49	3,2	1
L-B-L	51	61	-65	106	53	48	3,6	2
Развернутые формы основной цепи								
B-B-B	-88	93	-88	87	-111	148	2,1	164
B-B-R	-88	93	-102	122	-102	-54	2,4	52
R-L-B	-96	-51	51	41	-119	147	2,8	2
R-L-R	-95	-50	51	37	-160	-59	2,9	-
B-R-L	-88	90	-97	-52	52	49	3,3	-
L-B-B	50	48	-115	153	-100	114	3,4	9
L-B-R	50	49	-106	115	-101	-54	3,5	1
L-R-L	50	48	-110	-56	52	49	4,7	-

энергетический интервал 0–2,5 ккал/моль свободного аланинового трипептида. Они достаточно полно представлены во всех группах (361 – в свернутой, 228 – в развернутой и 193 – в полусвернутой). Наиболее часто встречаются формы R-R-R и B-B-B. Поскольку сопоставляемые участки белков и аланиновый трипептид имеют лишь сходные основные цепи (включая атомы C^β), а в остальном существенно различаются, то малый

**Геометрические и энергетические параметры оптимальных конформаций
молекулы Ac-L-Ala-L-Ala-NHMe**

Форма основной цепи	Угол вращения, град				$U_{\text{общ}}$, ккал/моль
	φ_1	ψ_1	φ_2	ψ_2	
Свернутые формы					
R-R	-54	-47	-78	-44	0
R-B	-87	-54	-110	50	0,2
B-L	-73	125	50	40	0,8
L-L	51	56	52	44	1,3
Развернутые формы					
B-B	-92	106	-94	82	0,3
B-R	-98	76	-90	-56	0,6
L-B	50	44	-114	158	1,3
R-L	-103	-47	50	44	1,6
L-R	56	44	-125	-53	1,7

энергетический интервал разброса энергии основной цепи свидетельствует о том, что реализующиеся в белках конформационные состояния фрагментов X-Y-Z являются близкими к оптимальным как в отношении скелетных взаимодействий, так и в отношении взаимодействий между основными и боковыми цепями соседних и удаленных остатков.

Дипептиды и трипептиды с остатками аланина и фенилаланина. Конформационный анализ перечисленных ниже ди- и трипептидов с остатками Ala и Phe: $C^\alpha CO-L-Phe-L-Ala-NHC^\alpha$, $C^\alpha CO-L-Ala-L-Phe-NHC^\alpha$, $C^\alpha CO-L-Phe-L-Ala-L-Phe-NHC^\alpha$, $C^\alpha CO-L-Ala-L-Phe-L-Ala-NHC^\alpha$, выполнен на основе полученных данных по монопептидам. Включение остатка фенилаланина обусловлено наличием у него объемной и вместе с тем лабильной боковой цепи, склонной вступать во взаимодействия с соседними остатками. Выбор аланина связан со значительной конформационной свободой основной цепи, что облегчает установление эффективных взаимодействий между концевыми звеньями трипептида.

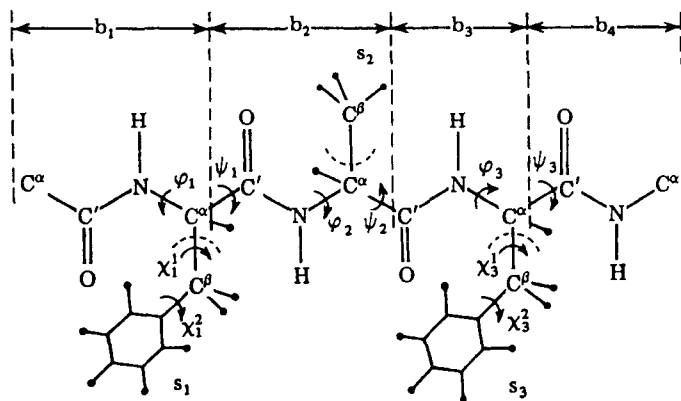
Исходные конформации ди- и трипептидов формировались исходя из трех (R, B, L) (см. табл. II.19) ротамеров Ala и девяти ротамеров Phe – предпочтительных оптимальных конформаций молекулы Ac-L-Phe-NHMe с углом вращения $\chi_2 \sim 90^\circ$ (табл. II.22). Расчетная модель трипептидного фрагмента приведена на рис. II.30. Наиболее низкоэнергетические конформации обоих дипептидных фрагментов имеют формы основной цепи B-B, B-R, R-R и R-B (табл. II.23 и II.24). Энергия этих конформаций у аланинового дипептида находится в интервале 0–0,6 ккал/моль (табл. II.21), причем состояния со свернутыми формами R-R и R-B предпочтительнее, чем с развернутыми B-B и B-R. Близки между собой, независимо от положения боковой цепи, величины энергии R и B у конформаций молекулы Ac-L-Phe-NHMe (табл. II.22). Поэтому при аддитивном

Геометрические и энергетические параметры оптимальных конформаций
молекулы Ac-L-Phe-NHMe

Форма основной цепи	Угол вращения, град			$U_{\text{общ}}$, ккал/моль
	φ	ψ	χ_1	
B	-115	164	60	0
	-110	152	180	0
	-124	150	-60	0
R	-99	-33	60	0,4
	-113	-60	180	0,3
	-137	-60	-60	0,1
L	40	44	60	2,6
	54	76	180	2,7
	53	60	-60	1,3

формировании структуры рассматриваемых дипептидов различие в конформационной энергии не должно было бы превышать 1 ккал/моль. На самом деле разброс составляет ~3,0 ккал/моль, и, кроме того, более низкую энергию приобретают развернутые конформации.

Таким образом, уже на уровне дипептида только за счет дополнительных взаимодействий, возникающих вследствие появления у одного остатка боковой цепи, наблюдается заметная дифференциация конформационных состояний по энергии. Глобальными оказываются конформации дипептида с основной цепью В-В. По-прежнему здесь малы (0,2 ккал/моль) взаимодействия между b_1 и b_3 , однако имеются благоприятные условия для стабилизирующих взаимодействий между ароматическим кольцом и удален-



Р и с. II.30. Расчетная модель трипептида $C^{\alpha}CO-L-Phe-L-Ala-L-Phe-NHC^{\alpha}$

Геометрические и энергетические параметры предпочтительных оптимальных конформаций фрагмента $C^{\alpha}CO-L-Phe-L-Ala-NHC^{\alpha}$

Конфор- мация*	Угол вращения, град						$U_{\text{общ}}$ ккал/моль
	φ_1	ψ_1	χ_1	χ_2	φ_2	ψ_2	
<i>Развернутые формы основной цепи</i>							
B_2-B	-109	149	179	87	-94	88	0
B_2-R	-109	147	176	88	-119	-59	0,3
B_1-B	-129	178	69	94	-85	92	0,6
B_1-R	-130	172	67	93	-98	-57	1,0
B_3-B	-130	162	-60	90	-111	149	2,6
B_3-R	-130	159	-60	90	-95	-51	2,7
<i>Свернутые формы основной цепи</i>							
R_1-R	-55	-37	60	89	-89	-44	1,4
R_1-B	-111	-39	63	92	-122	151	1,5
R_2-R	-56	-52	176	89	-86	-42	2,0
R_2-B	-111	-61	173	81	-122	154	2,0
B_2-L	-71	130	177	90	51	43	2,2
R_3-B	-138	-59	-60	91	-106	159	2,5
R_3-R	-138	-59	-60	91	-100	-51	2,6

* Индекс при В- или R-форме остатка Phe отвечает значению угла χ_1 в области 0 – 120° (1), 120 + –120° (2) или –120 – 0° (3).

ной от фенилаланинового остатка пептидной группой. У фрагмента $C^{\alpha}CO-L-Phe-L-Ala-NHC^{\alpha}$ эти взаимодействия (s_1-b_3) максимальны (–2,5 ккал/моль) при $\chi_1 \sim 60$ и 180° (конформации В–В, В–R) (табл. II.23), а у фрагмента $C^{\alpha}CO-L-Ala-L-Phe-NHC^{\alpha}$ они, т.е. b_1-s_2 , столь же эффективны при $\chi_2 \sim 60$ и –60° (конформации В– B_3) (табл. II.24).

У аланинового дипептида энергия более компактных форм основной цепи R–R и R–В, как уже отмечалось, меньше энергии развернутых форм В–В и В–R (см. табл. II.21). В случае же фрагментов с остатками Phe эти формы становятся значительно менее выгодными (1,5–3,0 ккал/моль). Энергетический диапазон скелетных взаимодействий у дипептидных конформеров R–R и В–В невелик (0,3 ккал/моль) (см. табл. II.21). Хотя свернутые формы стабилизируются дисперсионными взаимодействиями между пептидными звеньями b_1 и b_3 ($\sim -1,5$ ккал/моль), выигрыш энергии компенсируется более высокой, чем у развернутых форм, энергией отталкивания между смежными звеньями b_1 и b_2 , b_2 и b_3 . Поэтому соответствующие конформации обеих групп в отношении взаимодействий элементов основной цепи различаются не столь существенно. У наиболее выгодных конформаций R–R и R–В боковые цепи s_1 и s_2 сближены и могут взаимодействовать между собой. Но в данном случае из-за небольших размеров боковой цепи Ala эффект таких контак-

Геометрические и энергетические параметры предпочтительных оптимальных конформаций фрагмента $C^{\alpha}CO-L-Ala-L-Phe-NHC^{\alpha}$

Конформация	Угол вращения, град						$U_{общ}$ ккал/моль
	Φ_1	Ψ_1	Φ_2	Ψ_2	χ_1^2	χ_2^2	
<i>Развернутые формы основной цепи</i>							
B-B ₃	-101	143	-145	133	-58	89	0
B-R ₃	-94	127	-140	-59	-57	92	0,3
B-B ₁	-92	84	-143	153	54	89	0 5
B-R ₁	-92	90	-161	-45	57	92	1,3
R-L ₃	-100	-48	55	44	-55	92	1,9
L-B ₃	56	49	-107	157	-66	100	2 0
L-R ₃	53	54	-112	-56	-64	103	2 2
B-B ₂	-82	93	-112	145	180	88	2 3
B-R ₂	-87	90	-108	-56	179	87	2,5
L-B ₁	49	54	-117	161	64	87	2,8
<i>Свернутые формы основной цепи</i>							
R-B ₃	-98	-51	-131	150	-57	89	0,9
R-B ₁	-104	-56	-136	164	58	90	1,2
R-R ₁	-65	-40	-54	-38	64	89	1,8
R-R ₃	-58	-45	-120	-45	-58	87	1,9
R-B ₂	-99	-54	-111	146	180	88	2,2
B-L ₃	-71	124	53	42	-55	93	2,3
R-R ₂	-66	-47	-95	-53	179	77	2,8

тов (s_1-s_2) не так велик, как при взаимодействии бензольного кольца с пептидным звеном у развернутых форм. При замене остатка Ala на другой остаток ситуация может измениться.

Расчет фрагментов $C^{\alpha}CO-L-Phe-L-Ala-NHC^{\alpha}$ и $C^{\alpha}CO-L-Ala-L-Phe-NHC^{\alpha}$ позволил оценить раздельное влияние предшествующего и последующего остатков фенилаланина (или аланина) на конформационное состояние аланина (фенилаланина). Сравнение двух трипептидных фрагментов с центральными остатками Ala и Phe дает представление об одновременном воздействии на них остатков с обеих сторон. Рассмотрим кратко результаты анализа фрагмента $C^{\alpha}CO-L-Phe-L-Ala-L-Phe-NHC^{\alpha}$ (см. рис II.30), у которого рассчитаны все 72 возможные конформации с R и B состояниями остатков Phe и Ala, а также наиболее предпочтительные в отношении энергии пептидного остова 60 конформаций, включающих L состояние одного из остатков. В табл. II.24 для предпочтительных конформаций трех групп основной цепи и для самой невыгодной конформации в каждой группе приведены геометрические параметры и величины общей энергии $U_{общ}$.

Переход от дипептидных фрагментов к трипептидному сопровождается

**Геометрические и энергетические параметры оптимальных конформаций
фрагмента $C^{\alpha}CO-L-Phe-L-Ala-L-Phe-NHC^{\alpha}$**

Конформа- ция	Угол вращения, град										$U_{\text{общ.}}$ ккал/моль
	φ_1	ψ_1	χ_1^1	χ_2^1	φ_2	ψ_2	φ_3	ψ_3	χ_1^3	χ_2^3	
Развернутые формы основной цепи											
B_2-B-B_3	-104	144	-177	96	-84	102	-95	-159	-63	96	0
B_2-B-R_3	-102	148	180	92	-83	95	-88	-52	-64	96	0,1
B_1-B-R_3	-123	173	53	88	-78	109	-93	-66	-61	88	0,6
B_1-B-B_1	-135	166	65	101	-83	99	-130	164	55	86	0,8
B_2-B-B_1	-108	148	173	61	-92	115	-142	169	59	93	2,1
B_1-B-B_2	-132	179	66	94	-78	95	-102	141	174	80	2,2
B_1-B-R_1	-134	15	66	99	-83	91	-117	-35	52	87	2,2
B_1-L-R_1	-121	-52	54	98	26	74	-111	-34	68	87	11,2
Полусвернутые формы основной цепи											
R_1-R-B_3	-130	172	64	92	-97	-53	-132	141	-59	92	0,8
R_1-B-B_3	-114	-42	62	94	-134	62	-141	-59	-55	97	1,0
B_1-R-R_3	-129	169	59	81	-96	-44	-122	-52	-58	93	1,3
B_2-R-B_1	-109	141	175	96	-123	-58	-142	161	59	90	1,4
B_2-R-B_3	-110	135	178	90	-118	-63	-134	150	-57	90	1,5
R_1-B-B_3	-122	-42	62	95	-90	124	-140	118	-59	93	1,6
R_2-B-B_3	-106	-57	175	82	-95	143	-141	129	-60	91	1,7
R_1-R-B_1	-130	173	66	94	-93	-59	-140	153	57	90	1,9
R_2-R-R_3	-106	163	-174	53	-40	-46	-100	-49	-52	97	2,0
R_1-R-B_1	-130	173	66	94	-93	59	-140	153	56	90	2,1
R_2-R-R_3	-116	-56	176	86	-88	129	-136	-60	-58	94	2,2
R_1-B-R_3	-141	-56	-60	90	-91	120	-133	-60	-59	94	2,7
R_2-B-B_3	-140	-58	-60	97	-92	126	-140	-130	-61	93	2,7
R_1-L-R_1	-81	118	-63	92	53	67	-96	-37	78	88	9,9
Свернутые формы											
R_1-R-B_3	-55	-38	67	89	-83	-44	-138	113	-57	95	2,2
R_2-R-R_3	-59	-35	67	86	-76	-44	-140	-62	-58	95	2,8
R_1-R-B_3	-57	-55	177	88	93	-51	-134	146	-59	93	3,9
R_2-R-B_1	-59	-36	67	87	-95	-56	-141	160	57	96	4,5
R_1-R-B_3	-138	-60	-60	91	-95	-44	-129	153	-58	92	4,7
R_2-B-L_3	-138	-60	-61	91	-105	112	52	43	-57	98	7,5

дальнейшей дифференциацией форм по энергии. Если величины $U_{общ}$ у конформаций дипептидов, составленных из практически эквивалентных R- и B-форм, находятся в интервале 0–3,0 ккал/моль (см. табл. II 23 и II.24), то у конформаций трипептида (табл. II.25) они распределяются от 0 до 11,2 ккал/моль. Наименьшую потенциальную энергию имеют конформации B-формами основной цепи B-B-B и B-B-R. Развернутый характер пептидной цепи исключает взаимодействия b_1 с b_4 . В глобальных конфор-

мациях B_2-B-B_3 и B_2-B-R_3 ($\chi_1^1 \sim 180^\circ$, $\chi_1^3 \sim -60^\circ$, верхний индекс – номер остатка) все взаимодействия осуществляются при практически оптимальных формах основной цепи, энергия которых лишь на 1 ккал/моль выше, чем у аланинового трипептида. По взаимному расположению пептидного скелета и боковых цепей эти структуры весьма компактны. Ароматические кольца s_1 и s_3 направлены навстречу друг к другу и взаимодействуют как между собой ($-3,2$ ккал/моль), так и со всеми пептидными группами ($-8,9$ ккал/моль).

В целом можно отметить, что у наиболее предпочтительных развернутых конформаций имеет место согласованность всех видов взаимодействий. Специфичная для трипептидного фрагмента дополнительная стабилизация (s_1-s_3) происходит, во-первых, при низкоэнергетических конформационных состояниях каждого остатка, во-вторых, без существенного нарушения выгодных контактов на дипептидных фрагментах и, наконец, при формах основной цепи, близких по энергии (но не по значениям углов ϕ , ψ ; ср. табл. II.19 и II.25) к оптимальным конформациям аланинового трипептида. Следует, однако, иметь в виду, что самые выгодные конформации свободного фрагмента не всегда сохраняют свою предпочтительность будучи встроенными в сложную цепь. На первое место могут выйти структурные варианты, менее выгодные у свободного фрагмента из-за нереализованных внутренних взаимодействий, которые, однако, в условиях сложной цепи будут дополнительно стабилизированы взаимодействиями с более удаленными остатками.

Энергетическая дифференциация среди конформеров со свернутыми формами основной цепи $R-R-R$ и $R-R-B$ меньше, чем у рассмотренных. В этом случае пептидные звенья b_1 и b_4 сближены и расположены антипараллельно, что приводит к дисперсионной и электростатической стабилизации на $\sim 1,2$ ккал/моль. У лучшей в этой группе конформации R_1-R-B_3 энергия всех взаимодействий типа b_i-b_j меньше суммарной энергии дипептидных форм на $2,3$ ккал/моль, причем вклад за счет взаимодействия b_1-b_4 составляет $-1,8$ ккал/моль. По сравнению с аланиновым трипептидом основная цепь R_1-R-B_3 незначительно дестабилизирована ($0,7$ ккал/моль). Боковые цепи остатков Phe (s_1 и s_3) расположены по разные стороны свернутой формы трипептидного фрагмента и взаимодействовать между собой не могут. Как у $R-R-R$, так и у $R-R-B$ энергия минимальна при $\chi_1^1 \sim 60^\circ$ и $\chi_1^3 \sim -60^\circ$, т.е. при значениях, отвечающих самым выгодным конформациям среди форм $R-R$ и $R-B$ у дипептидных фрагментов с остатками Ala и Phe (сравните табл. II.23 и II.24 с табл. II.25).

Конформационный анализ последовательности $C^\alpha CO-L-Phe-L-Ala-L-Phe-NHC^\alpha$ показал прогрессирующий рост энергетической дифференциации по сравнению с наблюдаемым при переходе от моно- к дипептидным фрагментам. И здесь предпочтительные конформации более сложных участков пептидной цепи представляют собой лишь некоторые из комбинаций выгодных конформаций более простых участков. Такое же заключение следует и из анализа другого трипептидного фрагмента, а именно $C^\alpha CO-L-Ala-L-Phe-L-Ala-NHC^\alpha$ [115].

Таким образом, в исследовании пространственного строения олигопептидов предварительное рассмотрение конформационных возможностей составляющих их фрагментов значительно упрощает решение задачи. Обобщая полученные результаты, можно было бы заключить, что дальнейшее увеличение пептидной цепи будет сопровождаться еще большей дифференциацией конформационной энергии. Такое важное по своим следствиям предположение подтверждается данными расчета конформационных возможностей пентапептида с теми же остатками фенилаланина и аланина $\text{Ac-L-Phe-L-Ala-L-Phe-L-Ala-L-Phe-NHMe}$. Как показал конформационный анализ этой молекулы, выполненный на основе данных по ди- и трипептидам, в интервал 0–2,0 ккал/моль здесь попадает столько же оптимальных конформаций, сколько у одного дипептида [115]. Более существенно, однако, то обстоятельство, что во всех конформациях пентапептида, энергия которых не превышает 4,0 ккал/моль, центральный остаток находится в одном и том же состоянии (B_1). Следовательно, на данном участке только за счет ближних и средних взаимодействий происходит полное детерминирование пространственной формы остатка, расположенного в середине цепи. Увеличение длины и переход к полипептиду с регулярно чередующимися остатками Ala и Phe приводит к стабилизации конформации ($-B_1-B-$). Наиболее выгодной периодической структурой полимера, состоящего из так называемых спиралеобразующих остатков, оказывается не α -спираль, а β -структура.

Дипептиды и трипептиды с остатками пролина и фенилаланина. Анализ пространственного строения моно-, ди- и трипептидных фрагментов [20, 67, 83, 88, 89, 99, 104–111, 113–123] позволил проследить генезис конформационных состояний аминокислотных остатков, их геометрию и энергию валентно-несвязанных атомов в зависимости от длины пептидной цепи и природы смежных и близко расположенных остатков. Были рассмотрены объекты, включающие неполярные остатки Ala и Phe, из которых первый имеет значительную конформационную свободу и фактически лишен боковой цепи, а второй, напротив, обладает объемной и подвижной боковой цепью, склонной к эффективным взаимодействиям. Знание конформационных возможностей именно этих фрагментов не представляло самостоятельного интереса. Результаты их анализа важны в той степени, в какой они поддаются обобщению и помогают понять наиболее характерные особенности структурирования природной аминокислотной последовательности. Конечная цель, напомним, заключается в выработке правил свертывания природных пептидных цепей и создании количественного метода конформационного анализа белков. Сейчас нас конкретно интересуют средние взаимодействия. В этом плане рассмотренные объекты оказались полезными.

Однако воздержимся еще от формулировки на их основе общих заключений и обсудим результаты конформационного анализа других простейших олигопептидов, отражающих иные стороны взаимоотношений между соседними остатками. До сих пор не рассматривались, например, ситуации, возникающие в условиях сильно ограниченной конформационной свободы пептидной цепи или в случае взаимодействий между полярными остатками. В этом разделе остановимся на первом вопросе и, поскольку из всех

**Геометрические и энергетические параметры
оптимальных конформаций фрагмента $C^{\alpha}CO-Phe-Pro-NHC^{\alpha}$**

Конформация	Угол вращения, град					$U_{\text{общ}}$, ккал/моль
	φ_1	ψ_1	χ_1^I	χ_2^I	ψ_2	
<i>Развернутые формы основной цепи</i>						
B_2-R	-127	132	-175	77	-62	0
B_2-B	-108	133	180	90	107	0.3
B_1-R	-131	150	59	93	-57	0.5
B_1-B	-114	153	70	89	105	0.8
B_3-R	-130	151	-62	90	-49	1.8
B_3-B	-116	151	-63	89	120	2.2
L_2-R	53	83	-177	72	-46	2.6
L_3-R	52	67	-59	92	-50	3.0
L_2-B	52	76	-178	67	110	3.2
L_3-B	52	66	-59	92	111	3.2
L_1-R	34	67	45	99	-48	4.7
L_1-B	33	66	45	99	106	4.9
<i>Свернутые формы основной цепи</i>						
R_2-R	-59	-49	163	88	-45	4.1
R_2-B	-61	-48	177	90	106	4.9
R_3-R	-71	-46	-63	92	-48	5.7
R_3-B	-64	-47	-65	94	107	6.3
R_1-R	-77	-32	62	83	-48	12.6
R_1-B	-77	-30	63	81	107	13.4

стандартных аминокислот наименьшей свободой обладает пролин, про- анализируем конформационные возможности следующих ди- и трипепти- дов с его участием: $C^{\alpha}CO-Phe-Pro-NHC^{\alpha}$, $C^{\alpha}CO-Pro-Phe-NHC^{\alpha}$, $C^{\alpha}CO-Phe-Pro-Phe-NHC^{\alpha}$, $C^{\alpha}CO-Pro-Phe-Pro-NHC^{\alpha 1}$. Исходные структурные варианты дипептидных фрагментов, как и в предшествующем анализе, формировались исходя из монопептидных конформаций; у остатка пролина их всего две (R и B) (см. рис. II.11), а у фенилаланина – девять (табл. II.22). Результаты минимизации энергии при вариации всех углов вращения основной цепи и углов χ_1 и χ_2 боковой цепи Phe приведены в табл. II.26 и II.27. Угол ϕ у остатка пролина принимался равным -60° . У обоих дипептидов имеет место значительный разброс конформационной энергии. При аддитивном формировании структур рассматриваемых фрагментов различие в энергии не должно было бы превышать $\sim 2,0$ ккал/моль. Таким образом, только за счет дополнительных взаимодействий (в данном случае не только стабилизирующих, но и дестабилизи- рующих), которые возникают между двумя смежными остатками, происхо-

¹ В последующем тексте асимметрия аминокислотных остатков (L или D) указывается в случаях, когда они являются правовращающими, т.е. D -изомерами.

**Геометрические и энергетические параметры оптимальных
конформаций фрагмента $C^{\alpha}CO-Pro-Phe-NHC^{\alpha}$**

Конформация	Угол вращения, град					$U_{\text{общ}}$, ккал/моль
	Ψ_1	φ_2	Ψ_2	χ_1^2	χ_2^2	
<i>Свернутые формы основной цепи</i>						
R-R₃	-44	-111	159	-56	86	0
R-B₁	-49	-129	163	57	92	0,1
R-R₃	-45	-102	-44	-58	84	0,3
R-R₁	-47	-101	-34	61	88	0,6
R-B₂	-49	-109	148	179	83	1,4
B-L₃	117	56	54	-53	92	1,7
R-R₂	-48	-86	-45	178	85	1,8
B-L₁	106	37	53	42	95	3,2
B-L₂	112	54	63	-173	64	3,7
<i>Развернутые формы основной цепи</i>						
B-B₃	118	-102	159	-55	111	0,3
B-R₃	115	-97	-48	-56	104	0,5
R-L₃	-58	50	57	-54	127	1,2
B-B₁	110	-114	161	63	86	1,4
B-B₂	111	-112	147	179	83	2,1
B-R₁	106	-107	-36	62	88	2,2
B-R₂	110	-123	-59	117	85	2,6
R-L₂	-51	54	67	-175	66	3,9
R-L₁	-17	44	29	53	76	10,1

дит существенная энергетическая дифференциация конформационных состояний. Значение энергии взаимодействия зависит от порядка расположения остатков пролина и фенилаланина. Так, если в последовательности -Pro-Phe- более предпочтительны свернутые формы основной цепи R-B и R-R, то в последовательности -Phe-Pro- выгоднее развернутые B-B и B-R. Свернутые конформации в этом случае становятся практически запрещенными. Конформеры с L-состоянием фенилаланина имеют, как правило, более высокую энергию.

Низкая энергия развернутых форм фрагмента $C^{\alpha}CO-Phe-Pro-NHC^{\alpha}$ связана с выгодными контактами s_1 с s_2 и b_3 с s_1 при $\chi_1 \sim 60$ и 180° . Независимо от конформационного состояния остатка Pro (R или B) наиболее реальной формой основной цепи предшествующего остатка является B. Этот факт уже отмечался при рассмотрении конформационных возможностей диметиламидов N-ацетил-L-аланина и L-валина. В свернутых формах фрагмента $C^{\alpha}CO-Phe-Pro-NHC^{\alpha}$ взаимодействия R-R и R-B основной цепи остатка Phe с боковой цепью Pro, точнее, с метиленовой группой $C^{\delta}H_2$ имеют дестабилизирующий характер. Энергия отталкивания существенно зависит от угла χ_1 ; при $\chi_1 \sim 60^\circ$ она составляет

~ 10 ккал/моль, а при $\chi_1 \sim 180$ и $-60^\circ \sim 2,0$ ккал/моль. Взаимодействия групп $C^\alpha H_2$ и $C^\beta H_2$, принадлежащих пролиновому циклу с основной цепью b_1 , являются стабилизирующими и незначительными по величине. Следовательно, сделанное в работе [115] предположение о плоском строении пятичленного цикла Pro оправдано. Сравним результаты расчетов фрагмента $C^\alpha CO-Pro-Phe-NHC^\alpha$ (табл. II.27) и фрагмента $C^\alpha CO-Ala-Phe-NHC^\alpha$ (см. табл. II.24). Как свернутые, так и развернутые конформации этой пары имеют одинаковое распределение по энергии. Таким образом, остаток пролина по сравнению с остатком аланина не оказывает специфического влияния на форму последующего остатка. К аналогичному заключению в отношении конформаций с развернутой основной цепью можно прийти при сравнении результатов расчета фрагментов $C^\alpha CO-Phe-Pro-NHC^\alpha$ (см. табл. II.26) и $C^\alpha CO-Phe-Ala-NHC^\alpha$ (см. табл. II.23). Большое различие между остатками Ala и Pro наблюдается при R-состоянии предшествующего остатка, т.е. среди свернутых форм. В известных на сегодняшний день трехмерных структурах белков (> 3000 ; $\sim 10^6$ остатков) отмечено несколько случаев (если это не артефакты), когда форма основной цепи стоящего перед пролином остатка (не Gly) имеет форму R.

Расчет двух трипептидных фрагментов с чередующимися остатками Phe и Pro выполнен также на основе оптимальных форм монопептидов, т.е. независимо от полученных для дипептидов результатов. У фрагмента с последовательностью Phe-Pro-Phe число начальных приближений составило 162, а с последовательностью Pro-Phe-Pro – 36. Значения углов вращения во всех низкоэнергетических конформациях обоих трипептидных фрагментов, полученных после минимизации энергии по девяти переменным в первом случае и по шести во втором, оказались несильно отличающимися от углов в соответствующих конформациях дипептидов. В табл. II.28 для фрагментов Pro-Phe-Pro и Phe-Pro-Phe приведены предпочтительные конформации различных форм основной цепи и, кроме того, для каждой формы – самая высокая по энергии конформация. В табл. II.29 дано энергетическое распределение всех рассчитанных структурных вариантов трипептидных фрагментов. Здесь обращает на себя внимание заметная структурная детерминация в одном случае и равномерное распределение конформаций – в другом. Подавляющее большинство структур $C^\alpha CO-Phe-Pro-Phe-NHC^\alpha$, составленных только из самых выгодных монопептидных вариантов, имеют энергию, превышающую 4,0 ккал/моль. Рассмотрим сначала конформационные состояния трипептида $C^\alpha CO-Pro-Phe-Pro-NHC^\alpha$. У конформаций этого фрагмента с развернутыми формами основной цепи B-B-B и B-B-R отсутствуют взаимодействия между первым и третьим остатками. Взаимодействия же на дипептидных участках практически не отличаются от взаимодействия у свободных дипептидов. При этих условиях энергия структурных вариантов с формами B-B-B и B-B-R представляет собой аддитивную сумму энергий соответствующих дипептидных конформаций (за вычетом дублируемых энергетических вкладов). Конформации со свернутой (R-R-B) и полусвернутой (B-R-R и B-R-B) основными цепями обладают невыгодными контактами в пределах

Энергия оптимальных конформаций трипептидных фрагментов

C ^α CO-Pro-Phe-Pro-NHC ^α		C ^α CO-Phe-Pro-Phe-NHC ^α	
Конформация	U _{общ} , ккал/моль	Конформация	U _{общ} , ккал/моль
<i>Развернутая форма</i>			
B-B ₁ -B	1,4	B ₂ -B-B ₃	0
B-B ₂ -B	1,6	B ₁ -B-B ₃	0,6
B-B ₃ -B	2,0	B ₃ -B-B ₂	6,5
R-L ₁ -R	12,8	B ₂ -B-R ₃	0
		B ₃ -R-L ₁	16,9
<i>Полусвернутая форма</i>			
R-B ₁ -R	0	B ₁ -R-B ₁	1,3
R-B ₂ -R	0,6	B ₁ -R-B ₃	1,6
R-B ₃ -R	0,9	B ₂ -R-B ₂	7,0
B-L ₁ -B	0,4	B ₂ -B-L ₃	2,4
B-R ₂ -R	4,5	L ₁ -R-R ₂	8,0
B-R ₃ -R	4,8	R ₂ -B-B ₃	7,4
B-R ₁ -B	13,8	R ₁ -R-L ₁	24,9
<i>Свернутая форма</i>			
R-R ₂ -B	3,9	R ₂ -R-R ₃	6,2
R-R ₃ -B	4,2	R ₁ -R-R ₂	16,5
R-R ₁ -B	13,3		

дипептидных участков. Поэтому они, несмотря на стабилизирующие трипептидные взаимодействия, малореальны (см. табл. II.27).

К самым низкоэнергетическим относятся конформации R-B-R и R-B-B с полусвернутой основной цепью. Они не имеют дополнительной стабилизации; их энергия, как и B-B-B и B-B-R, равна сумме энергетических вкладов соответствующих дипептидных форм. Величины конформационной энергии фрагмента C^αCO-Pro-Phe-Pro-NHC^α, предсказанные для структур R-B-B, R-B-R, B-B-B и B-B-R на основе энергии дипептидных форм, как и можно было ожидать при незначительных взаимодействиях между крайними остатками, удовлетворительно совпадают с рассчитанными значениями U_{общ}. Следовательно, в данном случае при переходе от ди- к трипептиду отсутствует энергетическая дифференциация форм за счет дополнительной стабилизации, предпочтительными оказываются конформации, представляющие собой сочетания всех низкоэнергетических дипептидных форм.

У фрагмента с последовательностью Phe-Pro-Phe, напротив, специфические трипептидные взаимодействия играют значительную роль в энергии и геометрии конформационных состояний. Напротив, в двух конформациях с формой основной цепи B₂-B-B₃ (U_{общ} = 0) и B₁-B-B₃ (U_{общ} = 0,6 ккал/моль) (см. табл. II.28) энергии взаимодействия между первым и третьим остатками составляют соответственно -4,0 и

**Распределение конформаций трипептидных фрагментов
по энергиям**

Фрагмент	Интервал относительной энергии $U_{\text{общ}}$, ккал/моль						
	0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	>6
$C^{\alpha}CO\text{-}Phe\text{-}Pro\text{-}Phe\text{-}NHC^{\alpha}$	8	8	9	16	16	9	96
$C^{\alpha}CO\text{-}Pro\text{-}Phe\text{-}Pro\text{-}NHC^{\alpha}$	4	9	3	2	7	4	7

–4,3 ккал/моль, что сопоставимо с суммами энергии дипептидных взаимодействий (–5,9 и –5,0 ккал/моль). Решающий вклад в стабилизацию вносят контакты s_1 с s_3 и b_1 с b_3 . В предпочтительных конформациях трипептида $C^{\alpha}CO\text{-}Phe\text{-}Pro\text{-}Phe\text{-}NHC^{\alpha}$ реализация дополнительных стабилизирующих взаимодействий осуществляется без значительного ослабления контактов в пределах моно- и дипептидов и заметного изменения их геометрических параметров. Так, у конформации $B_2\text{-}B\text{-}B_3$ энергия монопептидных взаимодействий составляет 1,3 ккал/моль, дипептидных – 5,9 ккал/моль, у изолированных же фрагментов $B_2\text{-}B$ и $B\text{-}B_3$ суммирование соответствующих вкладов дает 1,3 и –6,6 ккал/моль соответственно. У конформации $B_1\text{-}B\text{-}B_3$ аналогичные составляющие равны 1,4 и –5,0 ккал/моль, а у $B_1\text{-}B$ и $B\text{-}B_3$ –1,2 и –6,4 ккал/моль.

Как и в предыдущих случаях, конформации трипептида, в которых имеет место максимальная дополнительная стабилизация, представляют собой комбинации наиболее выгодных дипептидных форм (сравните табл. II.26 и II.27 с табл. II.28). Характерно, что не все комбинации таких дипептидных форм оказываются комплементарными, т.е. имеющими пониженную потенциальную энергию. Например, у конформации $B_2\text{-}R\text{-}R_3$, образованной из более выгодных по сравнению с $B_3\text{-}R\text{-}R_1$ дипептидных форм, энергия моно- и дипептидных взаимодействий равна 1,7 и –4,1 ккал/моль; суммирование соответствующих величин свободных фрагментов дает 1,4 и –7,0 ккал/моль. Энергия трипептидных взаимодействий у $B_2\text{-}R\text{-}R_3$ составляет всего –1,8 ккал/моль. Следовательно, при сочетании форм $B_2\text{-}R$ и $R\text{-}R_3$ ослабление дипептидных взаимодействий полностью не компенсируется образованием новых контактов; потенциальная энергия трипептида в конформации $B_2\text{-}R\text{-}R_3$ ($U_{\text{общ}} = 5,5$ ккал/моль) больше суммы энергии свободных фрагментов в формах $B_2\text{-}R$ ($U_{\text{общ}} = 0$) и $R\text{-}R_3$ ($U_{\text{общ}} = 0,3$ ккал/моль).

Рассмотренные трипептидные фрагменты представляют собой два крайних случая. В одном из них – $C^{\alpha}CO\text{-}Pro\text{-}Phe\text{-}Pro\text{-}NHC^{\alpha}$ – практически отсутствует взаимодействие между первым и третьим остатками; в другом – $C^{\alpha}CO\text{-}Phe\text{-}Pro\text{-}Phe\text{-}NHC^{\alpha}$, оно весьма эффективно. Однако как в аддитивном, так и в неаддитивном варианте набор предпочтительных конформаций включает только низкоэнергетические состояния дипептидов и монопептидов. Таким образом, конформационный анализ

фрагментов с остатками Pro и Phe привел к тем же заключениям, что и анализ фрагментов с остатками Ala и Phe.

Дипептиды и трипептиды с остатками аспарагина и аспарагиновой кислоты. Для обоснованной формулировки метода априорного расчета стабильных конформаций олигопептидных молекул, основанного на знании конформационных возможностей образующих их фрагментов, представляется важным рассмотреть также объекты, включающие полярные аминокислотные остатки. К тем взаимодействиям, которые формируют пространственное строение пептидов, состоящих из остатков с гидрофобными боковыми цепями, полярные аминокислотные остатки добавляют электростатические взаимодействия и водородные связи, которым традиционно отводится главная роль в стабилизации не только α -спиралей и β -структур, но и белковых глобул. В этом разделе рассмотрены результаты теоретического конформационного анализа следующих фрагментов: $C^{\alpha}CO-Asn-Asn-NHC^{\alpha}$ и $C^{\alpha}CO-Asn-Asp-NHC^{\alpha}$ и $C^{\alpha}CO-Asn-Asp-NHC^{\alpha}$.

Расчет дипептидов и трипептида [124] выполнен на основе оптимальных форм метиламидов N-ацетил-L-аспарагина [125] и L-аспарагиновой кислоты [116]. У перечисленных фрагментов исследованы все возможные способы образования водородных связей и оценен их вклад, как и вклады невалентных и электростатических взаимодействий между соседними полярными остатками в конформационную энергию. Исходные приближения дипептидов формировались из 18 предпочтительных конформаций молекулы $Ac-Asn-NHMe$ и из девяти – молекулы $Ac-Asp-NHMe$. По форме основной цепи конформации делились на две группы: развернутые (B-B, B-R, R-L и др.) и свернутые (R-R, R-B, B-L и др.). В тех случаях, где возможно образование водородной связи между звеньями b_1 и b_3 , b_1 и s_2 , s_1 и b_3 или s_1 и s_2 , расчет выполнялся дважды – с учетом и без учета энергии водородной связи (табл. II.30). Разброс энергии среди конформаций дипептидного фрагмента $-Asn-Asn-$, представляющих собой все возможные комбинации R-, B- и L-форм остатков (за исключением L-L), составляет ~6,5 ккал/моль без учета и ~4,5 ккал/моль с учетом водородных связей. Энергия вариантов с L-L-формой основной цепи находится в интервале 4,0–9,0 ккал/моль. При аддитивном формировании структур разброс энергии не должен был бы превысить ~2,5 ккал/моль.

У многих развернутых конформаций B-B фрагмента $-Asn-Asn-$ возможно образование водородной связи между атомами кислорода основной цепи b_3 и водорода амидной группы s_1 . Особенно благоприятные условия для этого имеются у конформаций с эффективными дисперсионными и электростатическими взаимодействиями b_3 с s_1 ($\chi_1^1, \chi_2^1 \sim 60^\circ, 90^\circ$ и $180^\circ, 190^\circ$). Там, где они невелики, образование водородной связи неэффективно. Таким образом, водородные связи дополнительно стабилизируют наиболее выгодные по невалентным и электростатическим взаимодействиям конформации и не вносят существенных изменений в расположение конформаций в порядке энергетической стабильности.

Развернутая форма основной цепи B-R отличается от B-B только направленностью диполя звена b_3 ; взаимное расположение боковых цепей друг относительно друга и по отношению к b_1 и b_3 остается прежним.

**Энергия внутри- и межстаточных взаимодействий конформаций
различных форм основной цепи шейпов *e* и *f*
дипептидных фрагментов**

Шейп*	Форма основной цепи	$U_{\text{общ}},$ ккал/моль	$\theta = \psi_1 + \varphi_2,$ град	Энергия взаимодействия на участках, ккал/моль					
				Моно-		Ди-			
				b_1-s_1	b_2-s_2	b_1-b_3	b_1-s_2	b_3-s_1	s_1-s_2
$C^\alpha CO-Asn-Asn-NHC^\alpha$									
<i>e</i>	$B_{21}-B_{31}$	1,3	-13	1,0	1,0	-0,2	-1,9	-1,7	-0,2
	$B_{23}-R_{31}$	0,6	37	0,2	1,2	-0,3	-1,1	-1,9	-0,3
	$R_{11}-L_{31}$	0,7	16	0,4	2,0	-0,3	-2,3	-1,8	-0,2
<i>f</i>	$R_{11}-R_{31}$	0	-118	0,5	1,4	-1,5	-0,5	-0,3	-2,9
	$R_{11}-B_{31}$	0,2	-122	0,3	0,8	-0,8	-0,4	-0,1	-3,0
	$B_{21}-L_{31}$	1,6	165	1,6	2,1	-1,5	-0,5	-0,1	-3,3
$C^\alpha CO-Asn-Asp-NHC^\alpha$									
<i>e</i>	$B_{31}-B_{31}$	2,5	25	1,1	0,6	-0,2	-1,9	0	-0,4
	$B_{23}-R_{11}$	0,7	39	0	0	-0,3	0	-2,2	0
	$B_{31}-R_{31}$	2,5	29	1,1	0,8	-0,3	-1,8	0	-0,3
<i>f</i>	$R_{23}-R_{11}$	0	-177	0,8	0,1	-0,4	-0,7	-0,1	-2,9
	$R_{23}-B_{11}$	0	177	0,8	0,3	-0,5	-0,6	-0,1	-2,9
	$R_{11}-B_{21}$	1,5	-149	0,3	0,2	-0,6	-0,3	-0,1	1,4

* Шейп *e* означает развернутую форму дипептида, а *f* – свернутую.

Поэтому для конформаций с формой основной цепи В-В характерны те же, что и для В-В, типы стабилизирующих взаимодействий при оди-
наковых комбинациях углов χ_1, χ_2 боковых цепей s_1 и s_2 . Стабилизация за
счет водородной связи у В-В в целом выражена слабее, чем у В-В.
В конформациях с формой R-L реализация взаимодействий b_1-s_2 и s_1-b_3
происходит иначе, чем в предшествующих вариантах. Взаимодействие
 b_1-s_2 имеет место при значении угла $\chi_1 = -60^\circ$ для всех ротамеров по углу
 χ_1 первого остатка. Поэтому при R-L-форме основной цепи возможна
одновременная стабилизация за счет взаимодействий b_1 с s_1 и s_1 с b_3 , что
приводит к понижению энергии на $\sim 3,5$ ккал/моль. В некоторых конфор-
мациях R-L образуются сразу две водородные связи между кислородом
амидной группы s_1 и водородом основной цепи b_3 , а также водородом s_2 и
карбонильным кислородом b_1 . Вследствие значительной дисперсионной и
электростатической стабилизации энергия R-L становится сравнимой с
энергией некоторых форм типа В-В и В-В, несмотря на проигрыш по
монопептидным взаимодействиям ($\sim 1,5$ ккал/моль). В развернутых фор-
мах основной цепи L-В и L-R дополнительная стабилизация и образование
водородной связи имеют место только между группами b_1 и s_2 . Из-за
менее благоприятных монопептидных взаимодействий и слабых стабили-
зирующих контактов на дипептидном участке эти формы обладают высокой
энергией.

Сопоставим характеристики развернутых форм дипептида -Asn-Asn-
с результатами расчета конформационных возможностей рассмотренного
выше дипептида -Phe-Phe- (см. табл. II.18 и II.30). Это представляет
интерес, поскольку атом C γ боковой цепи как аспарагина, так и фенилала-
нина находится в гибридизации sp^2 и также имеет плоскую структуру.
Сравнение обнаруживает значительную близость обоих пептидов в отно-
шении характера стабилизирующих взаимодействий и значений углов χ_1^1
первого остатка и χ_1^2 второго, при которых эти взаимодействия осу-
ществляются. У дипептида -Phe-Phe- из-за большего размера аромати-
ческого кольца стабилизирующие взаимодействия эффективнее, чем у
-Asn-Asn-.

Для всех низкоэнергетических вариантов фрагмента C α CO-Asn-Asn-
NHCS α со свернутыми формами основной цепи актуальны взаимодействия
с s_2 и b_1 с b_3 . Стабилизация s_1-s_2 отсутствует только при $\chi_1^1 \sim -60^\circ$ и
 $\chi_1^2 \sim 180^\circ$, когда боковые цепи направлены друг от друга. Особенно зна-
тельна величина энергии взаимодействия s_1 с s_2 ($-3,0$ ккал/моль) в свер-
нутой конформации дипептида R $_{11}$ -R $_{31}$, в которой плоскости амидных
групп s_1 и s_2 располагаются параллельно друг другу на расстоянии ван-дер-
ваальсовых контактов. Среди структур, не содержащих водородных
связей, эта конформация является глобальной.

При свернутой форме основной цепи вероятность реализации водород-
ных связей значительно меньше, чем в случае развернутой формы. Кон-
формации R-В, как всегда, мало отличаются от R-R по геометриче-
ским характеристикам и энергетическому распределению. Взаимодейст-
вия групп b_1 и b_3 в R-В и R-R несколько ослаблены вследствие электро-

статического отталкивания между основной цепью и боковыми радикалами. В свернутой форме B-L, как и в R-R и R-B, возможна хорошая стабилизация s_1 с s_2 при всех значениях углов χ_1^1 и χ_1^2 , кроме -60° и 180° . В большинстве случаев при сближенности боковых цепей появляется вероятность образования водородных связей. Здесь также остается справедливым заключение о том, что реализация водородных связей осуществляется в конформациях с хорошими стабилизирующими взаимодействиями. Состояние L, несмотря на его более высокую энергию по сравнению с другими локальными формами аспарагина, в дипептиде -Asn-Asn- весьма вероятно, что объясняется наличием существенных стабилизирующих взаимодействий, не уступающих, а в ряде случаев превосходящих дополнительную стабилизацию в низкоэнергетических формах R-R и R-B. Известно, что остаток аспарагина по сравнению с другими остатками чаще встречается в трехмерных структурах белков в состоянии L. Отметим также, что в свернутых формах R-R, R-B и B-L боковые цепи остатков Asn не образуют водородных связей с остовом фрагмента, т.е. взаимодействия типа b_i - s_j на дипептидном участке не создают дополнительную стабилизацию β -изгибов пептидной цепи. При расчете фрагмента -Asn-Asn- выяснилось, что в развернутых и свернутых формах дипептида образование водородных связей в пределах одного остатка, обнаруженных у метиламида N-ацетил-L-аспарагина [125], приводит к дестабилизации взаимодействий b_1 с s_2 , b_3 с s_1 , s_1 с s_2 и в целом не дает понижения конформационной энергии.

Конформационный анализ второго дипептидного фрагмента $C^\alpha CO$ -Asn-Asp-NHC $^\alpha$ выполнен при ионизированном состоянии боковой цепи остатка аспарагиновой кислоты. Расчет показал, что у этого дипептида при свернутых, и развернутых формах основной цепи водородные связи образоваться не могут. Между b_3 и s_1 они не возникают из-за значительных дестабилизирующих монопептидных взаимодействий в остатке Asp при необходимых для их образования значениях углов вращения. Водородная связь между b_1 и s_2 , в образовании которой у -Asn-Asn- принимает участие NH $_2$ -группа боковой цепи второго остатка, в случае -Asn-Asp- также невозможна. Нереально и возникновение водородной связи между s_1 и s_2 из-за значительного электростатического отталкивания атомов кислорода.

Наблюдаемая аналогия в распределении конформаций по энергии -Asn-Asp- (как -Asn-Asn-) и -Phe-Phe- указывает на то, что электростатические взаимодействия и водородные связи не вносят существенных изменений в величины относительных энергий. Таким образом, стереохимическая природа боковой цепи (общим для аспарагина, аспарагиновой кислоты и фенилаланина является плоское расположение валентных связей атома C $^\gamma$) определяет характер невалентных взаимодействий и специфику конформационного распределения. Стабилизирующие невалентные взаимодействия между соседними остатками уже приводят к заметной дифференциации конформаций дипептидных фрагментов, существенно не нарушаемой учетом электростатических взаимодействий и образованием водородных связей. Это может служить определяющим фактором при расчете более сложных пептидов.

Конформационный анализ трипептидного фрагмента $C^{\alpha}O-Asn-Asn-Asp-NHC^{\alpha}$ дает возможность рассмотреть состояние центрального остатка аспарагина при одновременном воздействии на него с обеих сторон остатков аспарагина и аспарагиновой кислоты и, имея результаты анализа соответствующих дипептидов, оценить конформационную специфику фрагмента и роль взаимодействий между непосредственно не связанными концевыми остатками. Выбор нулевых приближений трипептида, как и ранее, произведен на основе монопептидных форм $Ac-Asn-NHMe$ и $Ac-Asp-NHMe$, т.е. независимо от результатов расчета дипептидов. Для форм основной цепи последовательности $-Asn-Asn-Asp-$ с R- и В-формами остатков рассчитан весь набор конформаций. С L-формой рассмотрены все варианты, в которых один из остатков Asn имеет эту форму. Энергия 1224 составленных таким образом структурных вариантов была проминимизирована при вариации 12 переменных двугранных углов основной и боковых цепей. Полученные величины $U_{общ}$ распределились в интервале 0–12,0 ккал/моль. В расчете учтена возможность образования водородных связей между звеньями b_4 и s_1 , b_1 и s_3 , b_4 и b_1 , s_1 и s_3 . Расчет показал, что учет водородных связей не вносит заметных изменений в распределение наиболее выгодных конформаций по энергии.

Для низкоэнергетических вариантов с развернутыми формами трипептида В–В–В и В–В–R характерно наличие дополнительного взаимодействия между боковыми цепями s_1 и s_3 , которое достигает –2,5 ккал/моль (табл. II.31). Это взаимодействие осуществляется без значительного ослабления контактов в пределах моно- и дипептидных участков. Так, у конформации $B_{21}-B_{31}-B_{31}$ энергия монопептидных и дипептидных взаимодействий составляет соответственно 2,3 и –5,7 ккал/моль; суммирование энергий изолированных фрагментов $B_{21}-B_{31}$ и $B_{31}-B_{31}$ дает 2,3 и –6,5 ккал/моль. Стабилизация за счет новых трипептидных взаимодействий (–2,0 ккал/моль) вдвое превышает повышение энергии дипептидных взаимодействий. Но так бывает не всегда. Например, в конформации $B_{11}-B_{11}-B_{31}$ монопептидные и дипептидные взаимодействия равны 0,7 и –3,7 ккал/моль. Суммирование же соответствующих величин трех свободных монопептидов и двух дипептидов $-Asn-Asn-$ и $-Asn-Asp-$ дает 0,6 и –4,8 ккал/моль. Энергия дополнительных трипептидных взаимодействий составляет всего –0,5 ккал/моль. Следовательно, ухудшение дипептидных взаимодействий не компенсируется образованием новых контактов.

В целом развернутые формы для трипептидной последовательности $-Asn-Asn-Asp-$ нереальны, так как относительная энергия даже самых предпочтительных вариантов этой группы составляет ~3,0 ккал/моль. Напомним, что в трипептидах с ароматическими остатками формы В–В–В и В–В–R, напротив, они самые выгодные из-за эффективных контактов типа s_i-b_j на дипептидных участках и существенной трипептидной стабилизации (см. табл. II.25 и II.28). Водородные связи между первым и третьим остатками в таких формах образуются как раз в тех конформациях, в которых сильны взаимодействия s_1 с s_3 . Однако дополнительная стабилизация за этот счет не превышает –0,5 ккал/моль, т.е.

**Энергия внутри- и межостаточных взаимодействий
некоторых конформаций различных шейпов пептидного скелета
фрагмента $C^{\alpha}CO-Asp-Asp-Asp-NHC^{\alpha}$**

Шейп	Форма основной цепи	$U_{общ}$, ккал/моль	Энергия взаимодействия на участках, ккал/моль				
			монопептидных			дипептидных	
			b_1-s_1	b_2-s_2	b_3-s_3	b_1-b_3	b_1-s_2
<i>ee</i>	$B_{21}-B_{31}-B_{31}$	2,8	0,6	1,1	0,6	0,2	2,0
<i>ef</i>	$B_{11}-R_{11}-R_{31}$	0,8	0,2	0,4	0,8	0,3	0,2
<i>fe</i>	$R_{33}-B_{31}-R_{31}$	3,4	0,3	0,9	0,8	0,4	0,4
<i>ff</i>	$R_{11}-R_{11}-R_{11}$	0	0,5	0,7	0,1	0,7	0,5

роль водородных связей здесь невелика. В полусвернутых формах фрагмента $-Asp-Asp-Asp-$ новыми по сравнению с дипептидными фрагментами являются взаимодействия между звеном b_1 и крайней боковой цепью (в форме $R-B-B \sim -2,5$ ккал/моль) и b_4 с s_1 (в форме $B-R-R \sim -2,0$ ккал/моль). Несмотря на сближенность звеньев b_4 и s_1 , в $B-R-R$ эффективная водородная связь образуется только в двух случаях (см табл. II.31). Среди свернутых конформаций трипептидного фрагмента наиболее предпочтительные имеют формы $R-R-R$ и $R-R-B$; 40 из них попадают в интервал 0–3,0 ккал/моль (в 17 энергия $<2,0$ ккал/моль). Это происходит вследствие более существенной стабилизации структур на уровне как моно- и дипептидных, так и трипептидных взаимодействий. Для них характерны контакты b_1 с b_4 ($\sim -1,3$ ккал/моль) и b_1 с s_3 ($\sim -2,0$ ккал/моль). Дифференциация конформаций со свернутыми формами по энергии обозначена наиболее резко: энергетический разброс достигает 8,0 ккал/моль ($R_{31}-R_{21}-R_{21}$). Образование α -спиральной водородной связи ($5 \rightarrow 1$) между крайними группами CO и NH малореально, так как из 108 конформеров с формой $R-R-R$ благоприятная ориентация этих групп у свободного фрагмента $C^{\alpha}CO-Asp-Asp-Asp-NHC^{\alpha}$ имеет место лишь в единичных случаях. Энергия конформаций, у которых один из остатков Asp находится в форме L , как правило, превышает 4,0 ккал/моль. Только среди конформеров с формой $B-L-B$ имеется несколько вариантов с энергией, близкой, например, энергии самых предпочтительных вариантов с развернутой формой $B-B-B$. Так, у $B_{21}-L_{21}-B_{11}$ величина $U_{общ}$ равна 2,7, а у $B_{22}-L_{32}-B_{11}$ – 3,0 ккал/моль.

Таким образом, проведенный анализ фрагментов $-Asp-Asp-$, $-Asp-Asp-$ и $-Asp-Asp-Asp-$ позволил оценить конформационную специфику пептидной цепи с полярными остатками. Оказалось, что электростатические взаимодействия полярных и заряженных боковых заместителей приводят к дополнительной стабилизации тех форм, которые предпочтительны по другим видам взаимодействий. Образование водородных связей не вносит существенного энергетического перераспределения в набор оптимальных

Энергия взаимодействия на участках, ккал/моль

дипептидных						трипептидных			
b_3-s_1	s_1-s_2	b_2-b_4	b_2-s_3	b_4-s_2	s_2-s_3	b_1-b_4	b_1-s_3	b_4-s_1	s_1-s_3
1,4	0,1	0,2	-1,5	0	-0,3	0	-0,1	-0,1	-1,8
0,8	0,2	-0,4	-0,8	-0,2	-2,1	-0,1	0	-1,6	-0,3
0,1	1,2	-0,3	-1,4	-0,1	-0,2	0	-2,5	0	0,1
0,3	1,9	-0,5	-1,0	-0,2	-1,5	-1,3	-1,5	-0,1	0,2

конформаций. В предпочтительных по энергии структурах трипептида имеет место согласованность между дисперсионными и электростатическими взаимодействиями и водородными связями. Специфические стабилизирующие взаимодействия на трипептидном участке реализуются при низкоэнергетических моно- и дипептидных конформационных состояниях.

Рассмотренный в 5 и 6 главах материал, касающийся конформационных возможностей разнообразных моно-, ди- и трипептидов, содержит минимум тех данных, которые необходимы для создания классификационной системы всевозможных оптимальных конформаций пептидов и разработки метода априорного расчета их пространственного строения.

Глава 7

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД КОНФОРМАЦИОННОГО АНАЛИЗА ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ

Основой количественного метода конформационного анализа служат бифуркационная теория самосборки и физическая теория структурной организации пептидов и белков (см. гл. 2) Бифуркационная теория исходит из представления о самопроизвольном свертывании белковой цепи как о нелинейном неравновесном процессе, обусловленном и направляемом необратимыми флуктуациями. Согласно физической теории нативная конформация белка считается плотно упакованной структурой, обладающей минимальной внутренней энергией и согласованной в отношении всех внутримолекулярных и межмолекулярных взаимодействий валентно-несвязан-

ных атомов белковой молекулы. Постулированная в теории гармония внутримолекулярных взаимодействий позволяет разделить проблему структурной организации белков на три менее громоздкие и в принципе поддающиеся последовательному решению проблемы ближних, средних и дальних взаимодействий. Под ближними подразумеваются взаимодействия валентно-несвязанных атомов одного остатка между собой и с атомами двух смежных пептидных групп, под средними – невалентные взаимодействия аминокислотного остатка с несколькими ближайшими предшествующими и последующими в белковой цепи остатками, а под дальними – взаимодействия остатка с более удаленными в последовательности остатками (см. рис. I.1).

Проблема ближних взаимодействий решена методом теоретического конформационного анализа, обычно используемого в исследованиях пространственного строения малых органических молекул. Для свободных монопептидов 20 стандартных аминокислот были найдены все возможные конформации и в каждом отдельном случае выявлена взаимообусловленность состояний основной и боковой цепей (см. гл. 5). Реальность полученных данных подтверждена результатами комплексного физико-химического исследования структур большого числа монопептидов в различных средах. Теоретические конформации монопептидов сопоставлены с геометрией основных и боковых цепей аминокислотных остатков в известных трехмерных структурах белков. Показано, что реализующиеся в белковых молекулах конформационные состояния остатков за редкими исключениями, которые, по-видимому, следует отнести к артефактам, отвечают наиболее выгодным конформациям свободных монопептидов. Средние и дальние взаимодействия ни в одном случае не вступают в противоречие с требованиями, диктуемыми ближними взаимодействиями. Их роль заключается в выборе конформации остатка из числа низкоэнергетических состояний свободного монопептида. Этап исследования ближних взаимодействий завершился составлением для свободных монопептидов 20 стандартных аминокислот универсальных наборов низкоэнергетических конформаций, необходимых и достаточных для описания всех конформационных состояний остатков, встречающихся в белковых структурах (см. табл. II.17).

Количество реализуемых в белках состояний каждого природного аминокислотного остатка соответствует конформационным возможностям свободного монопептида, т.е. набору (как правило, представительному) его низкоэнергетических конформаций. Поэтому учет взаимодействий между остатками даже у небольших пептидов сталкивается с огромным объемом вычислительных работ. Таким образом, проблема средних взаимодействий не могла быть решена на той же методологической основе, что и проблема ближних взаимодействий. Разработка специального метода конформационного анализа требовала знания особенностей межостаточных взаимодействий и правил свертывания пептидной цепи. Однако таких знаний не было, и получить их с помощью имеющихся средств можно было только для самых простейших объектов – моно-, ди- и трипептидов, проследив в этом ряду молекул за средними взаимодействиями и их влиянием на ближние взаимодействия. Безусловно, ряд короток, но

именно его изучение могло оказаться самым необходимым для следующего шага, поскольку позволяло проследить за наиболее существенными стерическими взаимоотношениями между близко расположенными в цепи и смежными, т.е. валентно-связанными друг с другом, остатками (см. гл. 6).

7.1. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРОСТРАНСТВЕННЫХ СТРУКТУР ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ

Главный вопрос, на который требовался однозначный ответ, заключался в получении правильного количественного представления о конформационных возможностях пептида на основе ограниченных наборов предпочтительных конформаций составляющих его фрагментов. Положительный ответ позволяет избежать расчета пептида путем перебора всех возможных конформационных состояний его остатков и строить анализ на поэтапном принципе, предваряя исследование всей молекулы расчетом ее фрагментов. Очевидно, этот принцип будет справедлив и окажется эффективным только в случае избирательной согласованности ближних и средних взаимодействий, т.е. когда конформационные возможности пептида описываются лишь некоторыми сочетаниями и только низкоэнергетических конформационных состояний фрагментов.

Исследования, призванные решить судьбу фрагментарного подхода, по сложности и конкретным целям рассматриваемых в них задач разделились на два уровня. Работы первого из них включали независимый конформационный анализ серии дипептидов с последующим сопоставлением конформационных состояний остатков с оптимальными формами свободных монопептидов. Работы второго уровня заключались в анализе трипептидов и составляющих их дипептидных фрагментов. Расчет также был независим, но исходными у тех и других служили предпочтительные конформации свободных монопептидов. Рассмотрен ряд ди- и трипептидов, состоявших из различных по своей природе и конформационным возможностям аминокислотных остатков.

Полученные результаты оказались обнадеживающими. Во всех без исключения случаях низкоэнергетические конформации более сложных молекул представляли собой комбинации самых выгодных конформаций более простых. Гармония ближних и средних взаимодействий проявлялась в согласованности между различными видами взаимодействий валентно-несвязанных атомов (невалентными, электростатическими, водородными связями) и конформационными состояниями основных и боковых цепей всех остатков. Существенным оказалось то обстоятельство, что в предпочтительных конформациях, например трипептида, все три аминокислотных остатка и два перекрывающихся дипептидных фрагмента, находясь в одном из низкоэнергетических состояний соответствующего свободного моно- или дипептида, осуществляют ряд дополнительных стабилизирующих взаимодействий.

Таким образом, было показано, что согласованность взаимодействий сопровождается существенным отклонением от аддитивности и носит

выборочный характер. Именно это свойство пептидных цепей ведет к детерминации конформационных состояний и выделению в конечном счете их из множества единичных пространственных структур. С удлинением пептидной цепи (при соответствующем составе и порядке расположения аминокислотных остатков) резко возрастает избирательность энергии пептида к его конформационному состоянию. Конечно, у исследованных объектов в силу их малости энергетическая дифференциация пространственных форм проявляется в зачаточной форме. Только в двух из рассмотренных примеров, а именно в последовательностях —Phe—Ala— и —Phe—Pro— отчетливо наблюдаются детерминации конформационных состояний с ростом цепи. Расчет показал, что уже в пентапептидах $\text{Phe—Ala—Phe—Ala—Phe}$ и $\text{Phe—Pro—Phe—Pro—Phe}$ у центрального остатка устойчивым становится практически единственное конформационное состояние B_1 , причем в первом случае при B , а во втором при R состоянии соседних остатков.

Выше были отмечены выводы принципиального порядка, которые следовали из анализа простейших пептидов. Они оказались достаточными, как будет видно позднее, для обоснования поэтапного подхода к изучению конформационных возможностей природных олигопептидов и пептидных фрагментов в белках. Наряду с ними исследование ди- и трипептидов позволило сделать ряд менее принципиальных, но важных с практической точки зрения заключений. Их ценность в том, что они позволяют существенно сократить объем вычислительных работ без нарушения строгости расчета. Например, в анализе пептидных фрагментов можно не учитывать ряд конформаций основных и боковых цепей у N - и C -концевых остатков. Для N -концевого остатка достаточно рассмотреть R - и B -формы основной цепи с ориентациями боковой цепи при значениях $\chi_1 \sim 60^\circ$ и 180° , а для C -концевого остатка — R - и L -формы основной цепи с ориентациями боковой цепи при $\chi_1 \sim -60^\circ$ и 60° . Последствия неучитываемых у первого остатка фрагмента L -формы и угла $\chi \sim -60^\circ$, а у последнего — B -формы и угла $\chi_1 \sim 180^\circ$ можно заранее предвидеть. Отмеченные формы L и B отличаются соответственно от B - и R -форм основных цепей C - и N -концевых остатков положением (приблизительно на 180° по углу ϕ в первом случае и ψ — во втором) крайних пептидных групп, что мало сказывается на результатах расчета. В этом можно убедиться, обратившись к таблицам предшествующей главы.

Все варианты с углом $\chi_1 \sim -60^\circ$ у первого остатка и $\chi_1 \sim 180^\circ$ у последнего имеют заведомо большую энергию, поскольку боковые цепи при этих значениях ориентированы в противоположные стороны и не в состоянии эффективно взаимодействовать ни между собой, ни с промежуточными остатками. Можно также не рассматривать варианты с R -формой у предшествующего пролину остатка (если он не Gly) и варианты с дипептидным фрагментом в $(L-L)$ -форме (если хотя бы один остаток не Gly). Такие конформационные состояния имеют сравнительно высокую энергию и в белках не реализуются. Кроме Gly, ни один из стандартных остатков почти не встречается в нативных конформациях белков в состояниях с H -формой основной цепи. Все это полезно иметь в виду при выполнении конкретных расчетов.

Однако самым существенным результатом изучения конформационных возможностей простейших пептидов, сконцентрировавшим в себе основные выводы и установившим их прямую связь с обилием, по существу, никак еще не систематизированных фактов о трехмерных структурах белков, явилось создание структурной классификации пептидов. Во многих исследованиях, особенно связанных с анализом большого числа вариантов и сложной многоступенчатой процедурой, классификация играет важную, если не решающую роль. Ее значение не ограничивается только объединением всех объектов исследования и наведением среди них определенного порядка.

Если систематика не искусственна, не просто каталог, построенный по чисто внешним, случайным признакам, а опирается на совокупность внутренних, самых существенных признаков, изучаемых объектов, иными словами, если систематика является естественной, подобной, например, системе сингоний в кристаллографии, то она становится не только конкретным воплощением принципов теории и отражением объективной взаимосвязи частей и целого, но и ключом к решению проблемы. Именно такой является классификация пептидов [106, 107], обоснованная, как увидим, с физической точки зрения и охватывающая все многообразие возможных конформационных состояний любого пептидного фрагмента и целой молекулы белка. Она позволяет получать представление о конформационных возможностях структурных вариантов больших классификационных групп по результатам анализа их отдельных представителей. Перед рассмотрением классификации уточним используемые в ней понятия, которых будем строго придерживаться в дальнейшем изложении.

Конформационное состояние аминокислотного остатка полностью задается (при фиксированных длинах связей и валентных углах) значениями двугранных углов вращения ϕ ($N-C^\alpha$), ψ ($C^\alpha-C'$), ω ($C'-N$) и χ ($C^\alpha-C^\beta$, $C^\beta-C\gamma$ и т.д.) (см. рис. II.8). Совокупность состояний остатков в данной последовательности однозначно определяет конформацию фрагмента. Под понятием "конформационное состояние", или "конформация", будем подразумевать строгие количественные характеристики геометрии остатка или фрагмента, которые позволяют вычислить значения энергии внутри- и межостаточных взаимодействий.

Двугранные углы ϕ , ψ основной цепи всех остатков в пептидах и белках всегда находятся на конформационных картах в низкоэнергетических областях R, B, L и H (см. рис. II.23 и II.24). Введем понятие формы остатка, которое означает принадлежность его конформационного состояния к одной из указанных областей пространства ϕ - ψ . Форма остатка (или форма фрагмента) прямо не связана с природой аминокислот и их последовательностями, а является полуколичественной характеристикой основной цепи, указывающей лишь область значений углов ϕ , ψ , а не сами значения. Для идентификации формы основной цепи достаточен четырехбуквенный код R, B, L и H. Смысл введения этого понятия заключается в том, что оно отражает общий характер взаимодействий атомов пептидного скелета, а также определяет возможности боковых цепей в отношении взаимодействий друг с другом и с основной цепью.

Реализация потенции той или иной формы основной цепи происходит при наложении на нее конкретной аминокислотной последовательности.

В дальнейшем изложении будет показано, что формы основной цепи фрагмента могут быть разделены на отдельные типы, которые мною названы шейпами пептидного скелета. В основе разделения форм по шейпам лежит дипептидный структурный элемент. Формы одного шейпа имеют аналогичный ход пептидной цепи и подобное взаимное расположение боковых цепей и звеньев основной цепи. Следовательно, они обладают близкими возможностями в отношении средних взаимодействий. Различия в этом случае связаны с энергией ближних взаимодействий и конформационной свободой форм остатков (R и В имеют меньшую энергию на карте ϕ - ψ и большую площадь, чем L и тем более H) (см рис. II.10). Шейп является качественным понятием, которое не зависит от конкретной аминокислотной последовательности, а определяется лишь числом остатков.

Пространственная классификация пептидных структур по конформациям, формам и шейпам построена по принципу "дерева". Все конформации делятся по формам основной цепи, а формы – по шейпам. Количество форм в каждом шейпе определяется числом возможных комбинаций R-, В-, L- и H-формы остатков. Число конформаций каждой формы зависит от природы остатка. Все возможные формы основной цепи и шейпы пептидного скелета предполагаются равноценными. Предпочтительность некоторых из них выявляется только в результате конформационного анализа, т.е. опробования на конкретной аминокислотной последовательности. В описанной структурной классификации возможна энергетическая дифференциация пространственного строения пептида на трех уровнях – шейпа, формы и конформации.

При обсуждении пространственного строения пептидов и белков конформационные состояния остатков в большинстве случаев удобно характеризовать не численными значениями углов ϕ , ψ , ω и χ , а с помощью уже упоминавшегося идентификатора типа $X_{i,j}^n$, где: X = R, В, L или H; n – номер остатка в последовательности, а индексы $i, j, \dots$ характеризуют положение боковой цепи ($\chi_1, \chi_2, \dots$); $i = j = 1$ соответствует значению углов χ в области $0-120^\circ$, 2 – в области $-120-120^\circ$ и 3 – в области $-120-0^\circ$. Все последующее рассмотрение результатов конформационного анализа пептидов и белков будем вести, используя идентификаторы $X_{i,j}^n$, и лишь в исключительных случаях будем приводить точные значения конформационных параметров.

Остался неосвещенным вопрос о принципе разделения форм основной цепи по шейпам. Он, так же как и принцип разделения конформаций по формам основной цепи, имеет серьезную экспериментальную основу. Конформационное состояние пептидной цепи фрагмента из двух остатков аминокислот определяется двумя парами углов: ϕ_i, ψ_i и ϕ_{i+1}, ψ_{i+1} . Однако для суждения о характере взаимодействия между смежными остатками интерес представляют лишь два угла – ψ_i и ϕ_{i+1} , или даже один двугранный угол вращения вокруг виртуальной связи $C_i^\alpha - C_{i+1} - \theta$, значение

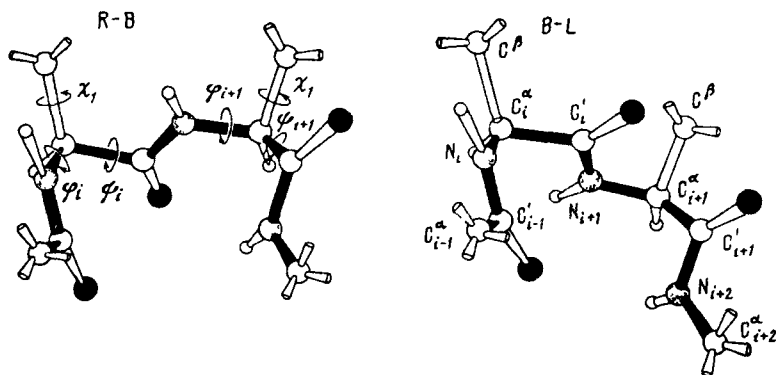


Рис. П.31. Формы основной цепи дипептидных участков R-B ($\varphi_i = -60^\circ$, $\psi_i = -60^\circ$, $\varphi_{i+1} = -120^\circ$, $\psi_{i+1} = 60^\circ$) и B-L ($\varphi_i = -60^\circ$, $\psi_i = 120^\circ$, $\varphi_{i+1} = 60^\circ$, $\psi_{i+1} = 60^\circ$) при значениях виртуального угла $\theta = \psi_i + \varphi_{i+1} = 180^\circ$

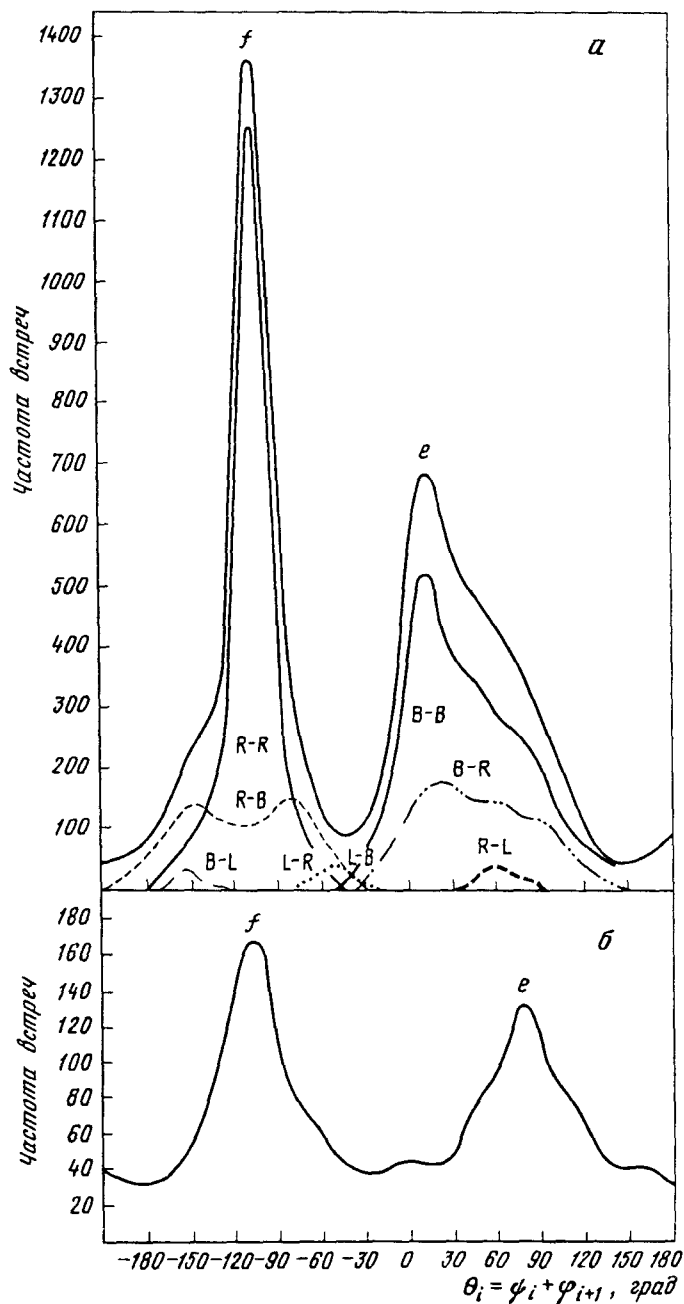
которого близко сумме ψ_i и φ_{i+1} , а при $\omega = 180^\circ$ совпадает с ней. Этот угол однозначно связан с ориентацией векторов $C_i^\alpha - N$ и $C_{i+1}^\alpha - C'$, задающих ход основной цепи, а также с ориентацией векторов $C_i^\alpha - C_i^\beta$ и $C_{i+1}^\alpha - C_{i+1}^\beta$, определяющих направленность двух боковых цепей. Если при изменении форм основных цепей смежных остатков, сопровождающемся значительным отклонением двух пар углов φ , ψ от своих прежних величин, угол θ остается постоянным, то не нарушается также ход основной цепи и взаимное расположение боковых цепей (рис. П.31). Происходит лишь поворот промежуточной (i -й) пептидной группы, приводящий к параллельному переносу части цепи на расстояние $\sim 1,5 \text{ \AA}$. Изменение виртуального угла θ всегда связано с нарушением хода основной цепи и переориентацией боковых цепей, т.е. с изменением средних взаимодействий. Поэтому можно ожидать, что структуры фрагментов с не сильно отличающимися значениями θ и углами φ , ψ в разных низкоэнергетических областях будут близки в отношении энергии средних взаимодействий.

В табл. П.30 для ряда конформационных состояний с различными формами основной цепи уже знакомых нам фрагментов $-\text{Asn}-\text{Asn}-$ и $-\text{Asn}-\text{Asp}-$ приведены значения энергетических параметров и величины угла θ . Легко видеть общность и различие в характере межостаточных взаимодействий в зависимости от угла θ . В первых трех конформациях обоих фрагментов с формами шейпа e наиболее эффективны взаимодействия типа b_1-s_2 и b_3-s_1 и в то же время практически отсутствуют взаимодействия между элементами основных (b_1-b_3) и боковых (s_1-s_2) цепей. В конформациях дипептидов с формами основной цепи типа f , имеющих существенно иные значения угла θ , межостаточные взаимодействия приобретают альтернативный характер; более эффективными становятся контакты основных (b_1-b_3) и боковых (s_1-s_2) цепей между собой, а слабыми – взаимодействия типа b_1-s_2 и b_3-s_1 . В табл. П.30 приведены расчетные данные. А каково взаимное расположение смежных аминокислотных

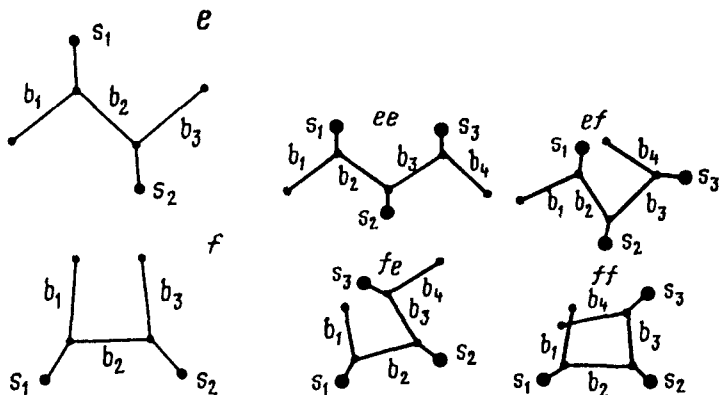
остатков в реальных ситуациях, в нативных конформациях белков? Сохраняются ли в сложных белковых структурах те же корреляции между смежными остатками, что и в свободных дипептидных фрагментах? Очевидно, об этом можно судить по значениям угла θ , наблюдаемым в нативных конформациях белков.

На рис. II.32, а приведена зависимость частот встречаемости различных форм основной цепи дипептидных фрагментов (не содержащих остатков Gly) от значений угла θ в 50 глобулярных белках, трехмерные структуры которых найдены методом рентгеноструктурного анализа с хорошим разрешением ($\leq 2,6$ Å). На рис. II.32, б приведены аналогичные данные для дипептидов, включающих хотя бы один остаток Gly. Кривые на обоих рисунках представляют собой огибающие вершины прямоугольников, ширина каждого из которых равна 20° в шкале θ , а высота – частоте встреч в структурах отобранных белков дипептидных фрагментов определенной формы с углами θ , попадающими в соответствующий 20 -градусный интервал. Полученное распределение опытных величин (число их > 7000), очевидно, не может вызвать каких-либо сомнений в экспериментальной обоснованности классификации форм основной цепи дипептидных фрагментов на два типа – шейки f и e . Формы R-R, R-B и B-L составляют шейп f , а формы B-B, B-R и R-L – шейп e . Редко встречаемые в кристаллических структурах белков формы дипептидных участков L-R, L-B и L-L могут занимать промежуточное положение. Кривые на рис. II.32 имеют несколько диффузный характер, что отражает, с одной стороны, действительный разброс значений угла θ в структурах белков, т.е. конформационную свободу остатков, а с другой – экспериментальные ошибки в определении значений ϕ и ψ , которые могут составить 10 – 15° . Однако несмотря на большую ширину полос, нельзя не заметить их дублетную, а в ряде случаев триплетную структуру. Это указывает на существование у всех форм основной цепи дипептидов двух или трех предпочтительных значений угла θ , обеспечивающих наиболее выгодные взаимные ориентации смежных остатков. Расстояния между максимумами полос распределения всех форм основной цепи равны 40 – 60° . Отмеченный опытный факт об относительной дискретности распределения значений угла θ целесообразно учитывать в конформационном анализе пептидов и белков при выборе исходных для минимизации энергии структурных вариантов.

Существование четкой корреляции между углами ψ_i и ϕ_{i+1} смежных остатков делает дипептидный фрагмент наиболее подходящей элементарной основой для классификации форм основной цепи на два типа – шейки f и e , единственной характеристикой которых является параметр θ (рис. II.33). У трипептидных фрагментов, содержащих два перекрывающихся дипептидных участка, формы основной цепи подразделяются на четыре шейки: ff , fe , ef и ee . В общем случае у фрагмента из n аминокислотных остатков могут реализоваться формы основной цепи 2^{n-1} различных шейпов. Представленные на рис. II.34 шейки трипептида позволяют (конечно, сугубо качественным образом) отметить особенности форм пептидного скелета каждого типа в отношении средних взаимодействий. Наибольший интерес вызывают новые, трипептидные взаимодействия



с. П.32 Распределение форм основной цепи дипептидных фрагментов, не содержащих (а) содержащих (б) остатки Glu, по величинам угла $\theta_i = \psi_i + \varphi_{i+1}$ в пятидесяти белках, чьи первичные структуры которых были определены методом рентгеноструктурного анализа с разрешением $< 2,0 \text{ \AA}$ [14. С. 120]



Р и с. II.33. Развернутый (e) и свернутый (f) шейпы дипептида

Р и с. II.34. Шейпы основной цепи трипептида

поскольку ситуация на дипептидных участках, рассмотренная выше, осталась практически неизменной. Для некоторых боковых цепей открылась возможность выбора. Например, боковая цепь s_2 при формах шейпа ff не может одновременно эффективно взаимодействовать с s_1 и s_3 . В структурах типа ee реальные взаимодействия боковых цепей между собой (s_1-s_3) и с элементами основной цепи (b_1-s_3 и b_4-s_1). Они могут быть эффективными и определять реализацию форм этого типа (например, структуру β -складчатого листа) при наличии у остатков в первом и третьем положениях достаточно больших и лабильных боковых цепей. В структурах шейпов ef и fe актуальными для стабилизации являются взаимодействия b_4 с s_1 в первом случае и b_1 с s_3 во втором, а шейпа ff — b_1 с b_4 и s_3 . Таким образом, у трипептидного фрагмента, как и у дипептидного, каждый шейп характеризуется специфическими возможностями образовывать средние взаимодействия, реализация которых зависит от конкретной аминокислотной последовательности и конформационных состояний остатков.

В табл. II.31 для четырех оптимальных конформаций фрагмента $-C^{\alpha}CO-Asn-Asn-Asp-NHC^{\alpha}$, имеющих формы основной цепи шейпов ee , ef , fe и ff , приведены энергетические вклады моно-, ди- и трипептидных взаимодействий, которые подтверждают сказанное об избирательном характере средних взаимодействий на дипептидном и трипептидном участках. Сопоставление соответствующих данных табл. II.30 и II.31 показывает, что образование дополнительных взаимодействий более высокого ранга, например между первым и третьим остатками, не ослабляет заметным образом средние взаимодействия меньшего ранга [ср., например, конформационные состояния $B_{21}-B_{31}$ участка $-Asn-Asn-$ и $B_{31}-B_{41}$ участка $-Asn-Asp-$ (табл. II.30) с конформацией $B_{21}-B_{31}-B_{31}$ трипептида (табл. II.31)]. В табл. II.32 отмечены различные типы взаимодействий, актуальные у разных форм всех возможных шейпов трипептидного фрагмента. Как можно заключить из данных таблицы, взаимодействия в e и f дипептидных шейпах и взаимодействия между первым и третьим остат-

Шейпы, формы основной цепи и межостаточные взаимодействия трипептидного фрагмента

Шейп	Форма основной цепи	Дипептидные взаимодействия									Трипептидные взаимодействия		
		b_1-b_3	b_1-b_2	b_3-s_1	s_1-s_2	b_2-b_4	b_2-s_3	b_4-s_2	s_2-s_3	b_1-b_4	b_1-s_3	b_4-s_1	s_1-s_3
ee	B-B-B B-B-R B-R-L	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
ef	B-R-R B-R-B B-B-L	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-
fe	R-B-B R-B-R R-R-L	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-
ff	R-R-R R-R-B R-B-L	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-

ками в *ee*, *ef*, *fe* и *ff* трипептидных шейпах имеют альтернативную природу. Именно это обстоятельство делает чувствительным конформационные возможности пептидов и белков не только к аминокислотному составу, но и к аминокислотной последовательности.

Выше рассмотрены в общем виде основные факторы, определяющие выбор пептидом того структурного типа или шейпа, который предоставляет наибольшие возможности для реализации средних взаимодействий. Обсудим теперь вопрос о том, каким образом происходит выбор формы основной цепи среди вариантов одного шейпа. Конформации с различными, но однотипными формами основной цепи, например В-В-В и В-*R*-*L* шейпа *ee* или *R*-*R*-*R* и *R*-В-*L* шейпа *ff*, в принципе не обладают друг перед другом преимуществами в отношении средних взаимодействий. Так, в дипептиде *Asn*-*Asn* (см. табл. II.30) у свернутых конформаций типа *f* R_{11} - R_{31} ($U_{\text{общ}} = 0$) и B_{21} - L_{31} ($U_{\text{общ}} = 1,6$ ккал/моль) энергия межэлектронных взаимодействий равна соответственно -5,2 и -5,4 ккал/моль. Предпочтительность первой конформации полностью обусловлена более низкой энергией (1,9 по сравнению с 3,7 ккал/моль) монопептидных взаимодействий, что является типичным случаем (ср. B_{21} - B_{31} и R_{11} - L_{31} ; табл. II.30).

Основные цепи, включающие остатки в *L*-форме, всегда проигрывают структурам того же шейпа с остатками в *R*- и *B*-формах по ближним взаимодействиям. Но это не единственная их слабость. На конформационных картах ϕ - ψ монопептидов (см. рис. II.10, б) область *L* не только на ~1,5 ккал/моль выше областей *R* и *B*, но и значительно уже. Следовательно, однотипные основные цепи с *R*- и *B*-формами остатков всегда энтропийно предпочтительнее основных цепей с *L*-формами остатков. Последние имеют более узкий диапазон разрешенных значений углов (ϕ , ψ) и, следовательно, меньшую возможность для образования компактных структур. Отмеченные соображения объясняют редкую встречаемость *L*-форм у остатков (за исключением *Gly*) в белках (см. рис. II.23). Эти же соображения служат обоснованием одного методического приема, существенно упрощающего поиск низкоэнергетических оптимальных конформаций пептидов. У каждого шейпа имеется лишь одна форма основной цепи с остатками в *R*- и *B*-областях (точнее, их две, но они отличаются лишь формой *C*-концевого остатка, и поэтому, как уже отмечалось, практически изотергичны).

На первом этапе конформационного анализа пептида при выяснении энергетических соотношений между оптимальными структурами разных типов пептидного скелета достаточно рассмотреть все возможные структурные варианты только с *R*- и *B*-формами остатков. Варианты с *L*-формами остатков следует анализировать только у тех шейпов, которые обладают наиболее низкоэнергетическими структурами с *R*- и *B*-формами остатков. Если у свободного фрагмента все принадлежащие одному шейпу конформации с *R*- и *B*-формами остатков имеют высокую относительную энергию, то варианты с *L*-формами остатков того же шейпа будут еще более высокоэнергетичными.

Шейпы *e* и *f* дипептидных фрагментов встречаются одинаково часто в трехмерных структурах белков (у 50 базовых белков, использованных

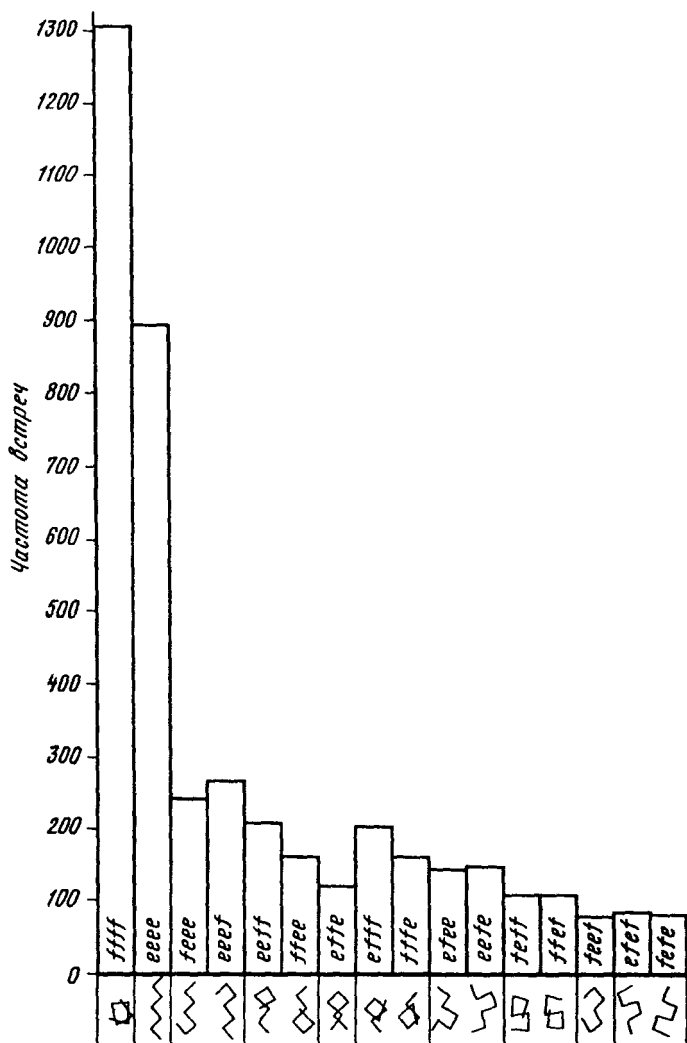


Рис. П.35. Распределение структур пентапептидных фрагментов по шейпам в пятидесяти белках, использованных для построения зависимости, приведенной на рис. П.32

для построения кривых рис. П.32, дипептидные структуры типа *e* встречаются 3005 раз, а типа *f* – 3002). Неравномерно распределение дипептидных форм в пределах каждого шейпа; доминирующими формами дипептидных фрагментов в белках являются R–R (*f*) и B–B (*e*). Рассмотрим теперь распределение в трехмерных структурах белковых молекул пептидных участков большего размера по шейпам. Выберем пентапептидный фрагмент, основная цепь которого теоретически может принимать формы 16 шейпов. Представление об их распределении даст гистограмма, приведенная на рис. П.35. Она построена на основе рентгеноструктурных

данных для тех же 50 базовых белков, которые были использованы для рис. II.32. Как свидетельствует гистограмма, все 16 типов возможных для пентапептидного фрагмента структурных образований, действительно, обнаруживаются в белках. Наиболее часто встречаются структуры шейпов *ffff* (~30%) и *eeee* (~20%), которые в основном представлены α -спиральной (R-R-R-R-R) и β -структурной (B-B-B-B-B) формами основной цепи, однако не только.

В заключение раздела остановимся на двух вопросах, которые при обсуждении поэтапного метода конформационного анализа пептидов и белков, казалось бы, должны иметь первостепенное значение. Речь идет о принципах разбиения пептидной цепи на фрагменты и критерии отношения конформационных состояний каждого рассчитываемого фрагмента к низкоэнергетическим, т.е. перспективным в последующем расчете более сложного участка пептидной цепи, и к высокоэнергетическим – неперспективным, исключаемым из расчета. Что касается первого вопроса, то постулируемая в теории структурной организации пептидов и белков согласованность ближних, средних и дальних взаимодействий не делает его принципиальным. Конечный результат в этом случае должен быть одним и тем же при любой схеме разбиения последовательности на фрагменты. Тем не менее разделение пептида на отдельные участки – ответственный момент конформационного анализа, поскольку от выбранной схемы существенным образом зависит объем вычислительных работ. Более того, заметный прогресс в расчете трехмерных структур высокомолекулярных белков можно ожидать при разработке метода априорной идентификации конформационно жестких и лабильных фрагментов аминокислотной последовательности. Обсуждение этого вопроса будет продолжено в конце книги после рассмотрения результатов расчета пептидов и белков.

Важным представляется вопрос о критерии отбора перспективных структурных вариантов. Коль скоро метод энергетической оценки пептидных конформаций является не строго теоретическим, а полуэмпирическим, то пороговое значение энергии при селекции структурных вариантов должно устанавливаться опытным путем. Однако этот путь фактически закрыт из-за отсутствия соответствующих экспериментальных количественных данных о конформационных возможностях линейных низкомолекулярных пептидов. Позднее эта тема будет рассмотрена подробнее. Сейчас лишь отметим некоторые факты, с помощью которых можно сделать ориентировочную оценку пороговой величины энергий. Так, в структурах белков практически отсутствуют остатки (кроме Gly) с H-формой основной цепи и редко встречаются остатки с L-формой; величины энергий этих форм уступают R- и B-формам всего лишь ~2,0 и 1,5 ккал/моль соответственно. Почти не встречаются в белках остатки, стоящие перед Pro, с R-формой основной цепи, энергия которой в этом случае составляет 4,5–5,0 ккал/моль. Можно привести еще несколько аналогичных фактов, указывающих на порядок величины пороговой энергии. Тем не менее подобные оценки не формализуют метод и не освобождают его полностью от интуиции исследователя.

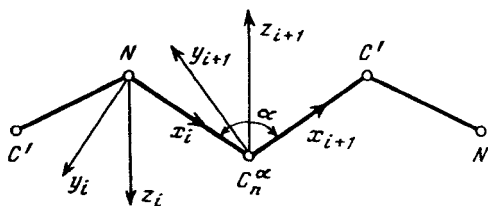
Рассмотренная классификация пептидных структур по конформациям.

формам и шейпам в значительной мере снимает вопрос о критерии отбора, во всяком случае, делает его несравненно менее актуальным. Данные многочисленных расчетов свидетельствуют о том, что при отборе конформаций нельзя руководствоваться одним или рядом критериев для фрагментов разной длины. Отбор должен не носить формальный характер, а являться результатом анализа структур в соответствии с их иерархической классификацией, природой остатков и размером фрагмента. При переходе от простого этапа расчета к более сложному, особенно в случае коротких фрагментов, следует оставлять для дальнейшего счета конформационные состояния всех типов независимо от величин их относительной энергии. При рассмотрении конкретных примеров в последующих главах этот вопрос будет рассмотрен более детально. Сейчас лишь отметим, что общим правилом при отборе структурных вариантов является отказ сначала от отдельных конформационных состояний, затем от форм основной цепи и в последнюю очередь от шейпов пептидного скелета. Обоснованность каждого из этих трех шагов поддается количественной объективной проверке.

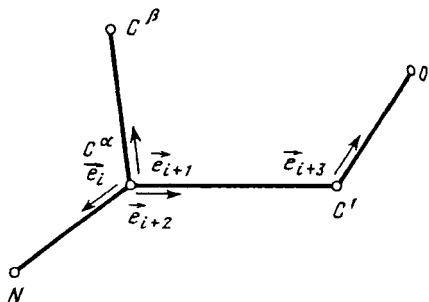
В последующих главах рассматриваются результаты конформационного анализа большой серии природных олигопептидов. Их пространственное строение практически полностью определяется взаимодействиями между близко расположенными в цепи остатками, и поэтому они представляют собой естественные объекты исследования средних взаимодействий. Здесь нельзя было ограничиться анализом единичных примеров в силу по крайней мере двух обстоятельств. Во-первых, изучение конформационных возможностей природных олигопептидов является, как станет ясно позднее, самым ответственным и сложным, но в то же время наиболее интересным этапом на пути к априорному расчету трехмерных структур белков. Очевидно, понимание пространственного строения и механизма спонтанной, быстрой и безошибочной укладки белковой последовательности в нативную конформацию невозможно без установления принципов пространственной организации эволюционно отобранных низкомолекулярных пептидов. Между природными олиго- и полипептидами нет четко очерченных границ, и количественная конформационная теория более простых молекул является естественной составной частью конформационной теории более сложных соединений той же природы. Во-вторых, знание пространственной организации и динамических конформационных свойств природных олигопептидов – гормонов, антибиотиков, токсинов и т.д. – необходимо также для изучения молекулярных механизмов узнавания, действия и регуляции биосистем, выявления структурно-функциональных особенностей пептидов и белков.

7.2. АЛГОРИТМ ПРОГРАММЫ РАСЧЕТА КОНФОРМАЦИЙ

В основе теоретического конформационного анализа лежит поиск оптимальных пространственных форм молекул при варьировании переменных геометрических параметров и учете энергетических вкладов от взаимодействия валентно-несвязанных атомов. Для определения энергии каждой оптимальной конформации необходимо расстояние между атомами выра-



Р и с. II.36. Локальные системы прямоугольных координат атомов пептидной цепи



Р и с. II.37. Направляющие вектора связей

зить в виде функции выбранных переменных. С этой целью координаты атомов сначала выражают в локальных системах координат, связанных с независимыми от конформационного состояния молекулы структурными элементами, а затем локальные системы переводят посредством переменных двугранных и валентных углов в единую для молекулы систему. Координаты атомов в процессе итерационного спуска могут рассчитываться с помощью одного из двух методов – матричного или векторного, приводящих, естественно, к одним и тем же результатам.

Матричный метод впервые был предложен Т. Шиманучи и С. Мидзуимой при расчете геометрии стереорегулярных кристаллических полимеров [126]. В анализе пептидов и белков локальные системы координат целесообразно связывать с атомами основной цепи. В правой прямоугольной системе координат ось x направляется от атома по связи его с последующим атомом, ось y располагается в плоскости пептидной группы, а ось z определяется выбором правой системы (рис. II.36). Координаты атомов боковых цепей задаются в локальных системах соответствующих атомов C^α . Переход от одной системы координат к другой сопровождается поворотом сначала на угол α вокруг оси z , а затем на угол φ вокруг оси x (α – валентный угол, φ – угол вращения вокруг связи $N-C^\alpha$). В матричном выражении эта операция выглядит так:

$$\begin{vmatrix} x_{k-1} \\ y_{k-1} \\ z_{k-1} \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} -\cos \alpha & -\sin \alpha & 0 \\ -\cos \varphi \cdot \cos \alpha & \cos \varphi \cdot \cos \alpha & \sin \varphi \\ -\sin \varphi \cdot \sin \alpha & \sin \varphi \cdot \cos \alpha & -\cos \varphi \end{vmatrix} \cdot \begin{vmatrix} x_k \\ y_k \\ z_k \end{vmatrix} + \begin{vmatrix} x_0 \\ y_0 \\ z_0 \end{vmatrix}$$

где x_0, y_0, z_0 – координаты начала k -той системы координат в системе $k-1$. Для перевода координат атомов из 1-й системы в k -ую (k – число атомов основной цепи) необходимо выполнить $k-1$ последовательных преобразований. Координаты атомов в боковой цепи подобным образом переводятся в систему, связанную с атомом C_n^β ; ось x направляется вдоль

связи $C_n^\alpha - C_n^\beta$ (n – номер аминокислотного остатка). От системы координат, связанной с атомом C^β , переход в систему атома C_n^α осуществляется с помощью следующего матричного преобразования:

$$\begin{pmatrix} x_{C_n^\alpha} \\ y_{C_n^\alpha} \\ z_{C_n^\alpha} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos[(180-\epsilon)/2] \cdot \cos(\xi/2) & \sin(180-\epsilon)/2 & \cos[(180-\epsilon)/2] \cdot \sin(\xi/2) \\ -\sin[(180-\epsilon)/2] \cdot \cos(\xi/2) & \cos(180-\epsilon)/2 & -\sin[(180-\epsilon)/2] \cdot \sin(\xi/2) \\ -\sin(\xi/2) & 0 & \cos(\xi/2) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x_{C^\beta} \\ y_{C^\beta} \\ z_{C^\beta} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} x_{C^\beta} \\ y_{C^\beta} \\ z_{C^\beta} \end{pmatrix}$$

где: ϵ – угол $C'C^\alpha N$; ξ – угол $HC^\alpha C^\beta$; $x_{C^\beta}, y_{C^\beta}, z_{C^\beta}$ – координаты начала C_n^β в системе координат C_n^α .

При использовании векторного метода, предложенного Л.А. Грибовым и соавт. [127], координаты атомов в общей системе рассчитываются по направляющим векторам связи. Вектор каждой связи ($\vec{e}^{i+3}$) (рис. П.37) определяется через три не лежащих в одной плоскости вектора предшествующих связей ($\vec{e}^i, \vec{e}^{i+1}, \vec{e}^{i+2}$) путем решения системы уравнений:

$$\begin{aligned} \cos(\vec{e}^i, \vec{e}^{i+3}) &= e_x^i \cdot e_x^{i+3} + e_y^i \cdot e_y^{i+3} + e_z^i \cdot e_z^{i+3}; \\ \cos(\vec{e}^{i+1}, \vec{e}^{i+3}) &= e_x^{i+1} \cdot e_x^{i+3} + e_y^{i+1} \cdot e_y^{i+3} + e_z^{i+1} \cdot e_z^{i+3}; \\ \cos(\vec{e}^{i+2}, \vec{e}^{i+3}) &= e_x^{i+2} \cdot e_x^{i+3} + e_y^{i+2} \cdot e_y^{i+3} + e_z^{i+2} \cdot e_z^{i+3}. \end{aligned}$$

Левые части уравнений легко определяются при заданных валентных углах и углах вращения. Например, $\cos(\vec{e}^i, \vec{e}^{i+3}) = \sin(C^\alpha C'O) \cdot \sin(C^\beta C^\alpha C') \cdot \cos(\theta - \psi) - \cos(C^\alpha C'O) \cdot \cos(C^\beta C^\alpha C')$, где: ψ – угол вращения вокруг связи $C^\alpha - C'$; θ – угол между векторами $\vec{e}^i$ и $\vec{e}^{i+3}$ при $\psi = 0$. Искомые координаты атома О находятся из соотношений:

$$\begin{aligned} x_0 &= x_{C'} + e_x^{i+3} \cdot l_{C'O}; \\ y_0 &= y_{C'} + e_y^{i+3} \cdot l_{C'O}; \\ z_0 &= z_{C'} + e_z^{i+3} \cdot l_{C'O}, \end{aligned}$$

где $l_{C'O}$ – длина связи между атомами О и C' .

К одной из основных вычислительных процедур теоретического конформационного анализа принадлежит минимизация потенциальной энергии. Поскольку энергетические поверхности пептидов имеют сложный рельеф, результаты расчета могут зависеть от выбранного метода минимизации. Поэтому была проведена проверка надежности и эффективности работы целого ряда алгоритмов, реализованных в библиотечных подпрограммах математического обеспечения ЕС ЭВМ [128]. При проверке использовался набор начальных приближений для минимизации конформаций тетрапептидных фрагментов тертиапина (см. гл. 10). При минимизации функций

многих переменных выполняется ряд последовательных итераций, каждая из которых включает два основных элемента: выбор направления спуска и поиск минимума в заданном направлении. Для выбора направления спуска наиболее экономичны и надежны алгоритмы, использующие значения первых производных. Среди них проверялись методы переменной метрики (Пирсона, Бройдена, Ньютона–Рафсона, Давидона–Флетчера–Пауэлла) и скорейшего спуска, поскольку они более эффективны, чем методы сопряженных градиентов при минимизации функций нескольких десятков переменных.

В методах переменной метрики направление спуска на k -й итерации вычисляется следующим образом:

$$\bar{x}_{k+1} - \bar{x}_k = \alpha_k \hat{N}_k \text{grad} F_k,$$

где: $\bar{x}_k$ – вектор аргументов минимизируемой функции F_k ; N_k – аппроксимация матрицы, обратной матрице вторых производных, вычисляемой в точке x_k , а α_k – число, определяемое в соответствии с выбранным методом одномерного поиска. Конформации использованных для проверки фрагментов тертиапина [129], отминимизированные при помощи разных методов, отличались по энергии на 2,0–3,0 ккал/моль и по величинам некоторых двугранных углов на 20–30°. Наилучшая сходимость результатов при всех начальных приближениях оказалась у метода Давидона–Флетчера–Пауэлла, далее следует метод Ньютона–Рафсона с параболической интерполяцией.

Точность вычисления энергии и двугранных углов можно оценить путем минимизации большого числа различных начальных приближений, приводящей в окрестность одного и того же локального минимума энергии. Такая процедура показала, что, например, у фрагмента MCD-пептида [130], состоящего из 13 аминокислотных остатков и имеющего 57 переменных, энергетические различия между отминимизированными конформациями составляли 0,2–0,4 ккал/моль, а значения отдельных двугранных углов отличались на 1–6°. Таким образом, положения локальных минимумов вычисляются с меньшей точностью, чем можно было бы ожидать при использовании критериев окончания минимизации. Вместе с тем метод Давидона–Флетчера–Пауэлла оказывается достаточно надежным.

Для минимизации энергии в заданном направлении было проверено два алгоритма: метод золотого сечения и вычисление минимума путем квадратичной аппроксимации с предварительной локализацией положения минимума [128]. Второй метод позволяет сократить число вычислений энергии, что приводит к уменьшению суммарного счетного времени в среднем на 30%. Конечный результат минимизации не зависит от алгоритма одномерного спуска, если правильно подобрана величина так называемой константы адаптации начального шага. В библиотечных подпрограммах начальный шаг в заданном направлении на каждой итерации вычисляется как произведение константы и всего расстояния, пройденного на предыдущей итерации. Сделано это для коррекции величины начального шага в процессе минимизации. Проверка на тетрапептидных тертиа-



Р и с. II.38. Блок-схема программы расчета оптимальных конформаций молекул

пиновых фрагментах показала, что при квадратичной аппроксимации оптимальная величина "константы адаптации шага" равна 0,5. Минимизация заканчивалась при выполнении следующих условий:

$$|U_i - U_{i-1}| < 0,01 \text{ ккал/моль}; \quad |x_1^i - x_1^{i-1}| < 0,6^\circ; \quad |x_k^i - x_k^{i-1}| < 0,6^\circ,$$

где: U_i – значение энергии после i -й итерации; x_1^i – величина i -го угла вращения после i -й итерации.

На рис. II.38 приведена простейшая блок-схема, иллюстрирующая взаимосвязь основных элементов программ конформационного анализа. В случае постоянных длин связей и валентных углов математические операции блока II выполняются только один раз. В расчетах линейных молекул блок IV отключен и процесс из блока III идет непосредственно в V и далее – VI. Затем происходит передача управления в блок VII для поиска минимума энергии и выбора нового приближения, которое направляется

вновь в блок III. При достижении требуемой точности ($\Delta U < \Delta U_{\text{зад}}$) выдается информация о геометрических и энергетических параметрах просчитанной оптимальной конформации. Далее происходит автоматическая засылка следующего нулевого приближения и повторение процесса поиска локального минимума, соответствующего новой конформации молекулы. Число пространственных форм, которое может быть рассчитано без остановки ЭВМ, не ограничено. Предусмотренная возможность селективного учета взаимодействий атомов отдельных частей молекул делает программу эффективной при оценке роли любых факторов в формировании пространственных структур [131].

В программе оперируют числовые элементы 12 массивов (M1–M12). M1 и M2 – массивы значений валентных углов и длин связей, M3 – массив углов вращения, M4 – массив, включающий требуемые математические и физические константы, эмпирические параметры потенциалов атом-атомных взаимодействий, заряды на атомах и соответствующие признаки в случае циклической молекулы. Массивы M1–M4 сохраняются без изменений при исследовании соединений одного класса. M5 – массив нулевых приближений, задающий значения варьируемым параметрам массивов M1–M3. M6 – массив фазовых углов, заполняется автоматически и состоит из величин, отвечающих качественно отличным частям молекулы. Можно отметить два основных типа фазовых углов, связывающих векторы при двух парах атомов – sp^2 – sp^3 и sp^3 – sp^3 гибридизациях. Массивы M7–M12 – основные для цифровой шифровки молекулы. M7 – двумерный массив номеров, предшествующих троек векторов, посредством которых вычисляются последующие векторы молекулярной системы. M8 – основной массив для вычисления направляющих косинусов векторов рассматриваемой системы. M9 – двумерный массив пар чисел для каждого вектора. Он используется при вычислении координат атомов и автоматической отсортировки фиктивных векторов, вводимых для удобства вычисления фазовых углов. Первое число каждой пары соответствует номеру атома, от которого берет начало вычисляемый вектор, второе – номер валентной связи в массиве M2, вдоль которой направлен искомый вектор (для фиктивных векторов это число равно 0). M10 – массив пар номеров атомов, взаимодействие между которыми не учитывается. К таким парам, например, относятся атомы, расстояния между которыми в любых конформациях остаются неизменными, что позволяет существенно ускорить процесс поиска локальных минимумов. При замене одного из логических условий в блоке VI массив M10 принимает участие уже в противоположном процессе. В этом случае каждая пара чисел представляет собой номера атомов, взаимодействие между которыми, и только между ними, дает вклад в общую энергию. Такой прием иногда бывает полезен при вычислении энергии взаимодействия между отдельными небольшими частями большой молекулы. M11 – массив пар номеров атомов, участвующих в водородном связывании, а M12 – массив признаков атомов по их принадлежности к тому или иному химическому элементу. Необходимость массива M12 связана с выбором соответствующей потенциальной функции для учета энергии взаимодействия между конкретной парой атомов.

7.3. ПРОБЛЕМА МНОЖЕСТВЕННОСТИ МИНИМУМОВ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ПОВЕРХНОСТИ ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ

Самым серьезным препятствием на пути к априорному предсказанию конформационных возможностей пептидов и белков считается проблема поиска глобального минимума энергии на многомерной потенциальной поверхности. Решение этой проблемы должно означать появление метода, который позволил бы рассчитывать по известной аминокислотной последовательности геометрию ее глобальной конформации из огромного, практически бесконечного количества других структурных вариантов, также состоящих из энергетически наиболее предпочтительных состояний всех аминокислотных остатков и в этом отношении, казалось бы, равновероятных. Предпринятые за последние десятилетия многочисленные попытки решить как тем или иным образом обойти проблему множественности минимумов пока не привели к цели. В настоящее время поиски в этом направлении не только не ослабевают, а, напротив, как показано ниже, продолжаются с возрастающей интенсивностью.

Перед рассмотрением результатов, полученных здесь за последние годы, по-видимому, целесообразно обратить внимание на заведомую обреченность исследований такого плана. Она обусловлена отсутствием у проблемы множественности естественной основы и ее принадлежностью к нерешаемым в принципе псевдопроблемам. Столь неутешительный вывод неизбежно следует из соображений общего порядка о невозможности ни по ходу биосинтеза белковой цепи, ни в процессе ее ренатурации, ни, тем более, при компьютерном поиске всех мыслимых конформационных вариантов. Сдерживает разработку подхода к априорному расчету механизма свертывания белка и его нативной структуры отнюдь не громоздкость задачи, ее математические и алгоритмические сложности. Проблема свертывания белка десятилетиями остается нерешенной исключительно из-за отсутствия понимания того, каким образом флуктуирующей белковой цепи при спонтанно протекающем случайно-поисковом механизме удастся избежать перебора всех конформационных состояний и свернуться за считанные секунды. Выход из этой ситуации дает бифуркационная теория самоорганизации белка (см. разд. 2.1 и 16.3). А теперь обратимся к анализу литературы.

Во втором томе настоящего издания [132] были обсуждены возможности и перспективы статистического подхода и эмпирических алгоритмов предсказания, с помощью которых пытаются решить проблему свертывания белка на основе данных рентгеноструктурного анализа о пространственном строении белков, α -спиральной гипотезы Полинга и Кори, гидрофобной концепции Козмана и стереохимических ограничений. В этой главе рассматриваются преследующие ту же цель теоретические методы расчета оптимальных конформаций пептидов и белков, предложенные в конце 1980-х и первой половине 1990-х годов. В настоящее время, по-видимому, можно считать общепринятым представление о нативной конформации белка как о термодинамически равновесном состоянии [133–136]. Впервые оно было постулировано Р. Ламри и Г. Эйрингом в 1954 г. [137], однако больше известно как термодинамическая гипотеза

К. Анфинсена [138]. В литературе встречается также иное мнение, согласно которому молекула белка находится в метастабильном состоянии, т.е. отвечает не глобальному, а одному из локальных минимумов свободной энергии. Такая точка зрения нашла отражение в так называемом парадоксе К. Левинтала [139] и кинетической гипотезе свертывания белка Д. Уетлауфера и С. Ристоу [140]. Однако задолго до публикации этих работ (в 1935 г.) Э. Бауэр – автор первого труда по теоретической биологии, разработал концепцию, в которой специфика структурной организации белка, определяющая его биологические свойства, объяснялась особым деформированным состоянием молекул [141]. Представление, развитое в работах [139–141], хотя еще и привлекается в энзимологии при трактовке механизма фермент-субстратных взаимодействий [142–149] (правда, все реже и только для феноменологического описания), в исследованиях нативных конформаций почти утратило свое былое значение. О последних усилиях в этом направлении можно узнать в работах [150, 151]. Подавляющее большинство теоретических разработок структурной проблемы белка исходит сейчас из предположения о том, что его активная пространственная форма обладает абсолютным минимумом свободной энергии.

Сложность определения глобальной конформации белка, как уже отмечалось выше, заключается прежде всего в большом числе степеней свободы, что ведет к чрезвычайному, превосходящему возможности любого компьютера, количеству локальных оптимальных конформаций. М. Васкес, Г. Немети и Г. Шерага в своем обстоятельном обзоре теоретических исследований конформаций пептидов и белков представляют проблему минимизации мультиплетной потенциальной поверхности по многим переменным в виде своеобразного соотношения неопределенности. Так, они пишут: "При анализе полипептидных и белковых систем с помощью расчетных методов перед исследователем встает внутренне противоречивая дилемма: или более тщательное моделирование, или более точное энергетическое описание" [136. С. 2184]. Предполагая существование только этих двух альтернатив, авторы обзора разделили все работы в области теоретического конформационного анализа пептидов и белков на две группы. В исследованиях одной из них акцент делается главным образом на прецизионном описании рассчитываемых систем, используя при этом упрощенную форму потенциальной функции. В исследованиях второй группы, напротив, основное внимание уделяется более точному энергетическому описанию невалентных взаимодействий атомов и учету сольватационных эффектов, ограничивая в то же время конформационное поле рассматриваемых систем. При таком восприятии структурной проблемы пептидов и белков дальнейшее развитие теоретического конформационного анализа Васкес, Немети и Шерага связывают с совершенствованием алгоритмов, расчетных программ и вычислительных машин, т.е. развитием математического и технического обеспечения метода. "Необходимо подчеркнуть, – замечают они, – что прогресс в методологии эффективных конформационных поисков и, особенно, глобальной оптимизации несомненно приведет к улучшению описаний потенциальной энергии более сложных систем" [136. С. 2185].

Вывод достаточно очевиден, однако нельзя рассчитывать на то, что чисто методологический прогресс сможет определять магистральное направление развития теоретического конформационного анализа и привести к достижению главной цели. Поиск глобальных конформаций пептидов и белков сдерживается не только грубостью расчетной механической модели или аддитивным характером учета невалентных взаимодействий, не приближенностью эмпирических потенциальных функций или неудовлетворительностью оценки влияния растворителя и, наконец, не отсутствием методов автоматического спуска к многим оптимальным конформациям, разделенным потенциальными барьерами, или несовершенством методов минимизации энергии по многим переменным. Структурная проблема белка остается нерешенной вследствие астрономического количества локальных минимумов энергии на потенциальной поверхности каждого белка, а также, и, быть может, в большей степени из-за отсутствия четких представлений о механизме свертывания белковой цепи в нативную конформацию и принципах структурной самоорганизации последней, т.е. отсутствия у расчетных методов серьезной физической теоретической базы. Лишь после того, как будет найден выход из этой ситуации, свое значение приобретут вопросы, касающиеся методологических аспектов расчета оптимальных конформаций. Поэтому дилемма "или более тщательное моделирование, или более точное энергетическое описание" сейчас не актуальна, а разделение теоретических исследований пептидов и белков на две группы по методологическому признаку представляется искусственным, хотя и адекватно отражающим сегодняшнее положение дел. О каком прогрессе методологии может идти речь, если, как позднее справедливо замечают сами авторы обзора, за исключением очень простых систем лишь с несколькими переменными, например, олигопептидов с менее, чем четырьмя остатками (без прямого учета растворителя и в приближении жесткой валентной схемы) невозможно систематически исследовать всю потенциальную поверхность для нахождения самого глубокого минимума" [136. С. 2192]. Правильно рассчитывать конформационные возможности тетрапептидов умели уже в начале 1970-х годов.

Для современных теоретических конформационных исследований пептидов и белков в отсутствие принципиальных достижений в решении проблемы их молекулярной структурной организации остаются по-прежнему характерными следующие два момента: использование в расчете глобального минимума большого числа различных процедур и чисто методологическая направленность поиска, строящегося по единой схеме – чем сложнее исследуемый объект, тем грубее расчетная модель. Ниже дано краткое описание наиболее часто используемых подходов с указанием работ, выполненных в последние годы. Полученные результаты обсуждаются в главах 14 и 16.

Метод наращивания пептидной цепи. Суть этой процедуры заключается в разделении пептидной цепи на малые фрагменты и их независимый конформационный анализ с использованием в качестве исходных приближений низкоэнергетических состояний свободных аминокислотных остатков. Чтобы избежать экспоненциального расширения возможных опти-

мальных пространственных форм пептидной цепи при объединении фрагментов, из найденного для каждого из них набора проминимизированных конформаций исключаются менее предпочтительные по энергии состояния, которые уже не будут принимать участие в последующем расчете. По многим причинам эта вынужденная операция, определяющая конечный результат, является самым легкоуязвимым шагом данного метода, поскольку он в значительной мере основывается на субъективном выборе критической энергии отсечения и, в отсутствие теоретической основы метода, не поддающимся однозначной трактовке предположению о том, что ближние взаимодействия играют доминирующую роль в определении конформационных состояний пептидов и белков [152, 153]. Детальные описания различных версий процедуры наращивания цепи, в том числе предложенных недавно, содержатся в работах [153–158].

По мнению Васкеса, Немети и Шераги, "... метод приводит к хорошим результатам в расчетах коротких олигопептидов и в очень редких, особых случаях – более сложных; в отсутствие дополнительной информации его применение быстро становится неконтролируемым для пептидов из 10 и более аминокислот". Далее они высказывают точку зрения принятую, но в то же время подтверждающую высказанную выше мысль об отсутствии четкого представления о структурной организации молекул пептидов и белков. Авторы пишут: "Так как в самой процедуре наращивания цепи дальние взаимодействия не могут быть учтены на ранней стадии, то, следовательно, данная процедура не будет работать, когда эти взаимодействия превалируют над ближними взаимодействиями" [136. С. 2193]. Тем самым допускается, что нативные конформации белков могут находиться в напряженном состоянии. Если это так, метод последовательного наращивания полипептидной цепи, как и любой другой, связанный с минимизацией энергии, в принципе бесперспективен для предсказания пространственного строения белков.

Известные на сегодняшний день результаты конформационного анализа сложных олигопептидов и небольших белков получены не путем априорного расчета, т.е. при использовании только аминокислотной последовательности, а с привлечением дополнительной экспериментальной информации, ограничивающей количество рассматриваемых вариантов. Как правило, это данные рентгеноструктурного анализа и ЯМР о межатомах или межостаточных расстояниях [159–163]. Один из используемых подходов к решению конформационной задачи сложных пептидов, не выходящий за рамки рассматриваемого метода наращивания цепи, заключается в замене интуитивной селекции оптимальных форм фрагментов для последующего счета исследователем с помощью статистической процедуры Монте Карло [164–170]. Поскольку исчерпывающее исследование всех минимумов потенциальной поверхности по-прежнему остается недостижимым, подобный способ упрощения задачи вряд ли что-либо меняет по существу. Предоставляя выбор случаю, он как бы снимает с исследователя ответственность за результат расчета и создает видимость его объективности.

Метод деформации с одновременной минимизацией энергии. З. Ли и Г. Шерага разработали процедуру поиска глобальной конформации пепти-

да, основанную на минимизации энергии в случайно выбранных локальных минимумах потенциальной поверхности (Монте Карло минимизация) при беспорядочной деформации единичных двугранных углов в области от 0 до 2π [171, 172]. По завершении итерационной операции новая конформация проходит проверку по так называемому критерию Метрополиса [173] и принимается для дальнейшего анализа или отбрасывается. Подобный подход вскоре был использован рядом исследователей. В методе М. Саундерса, получившем название стохастического [174], большие деформации производятся в декартовых координатах атомов, но, как и у З. Ли и Г. Шераги [172], вызываются локальной минимизацией. Метод Д. Фергюсона и Д. Рабера также основан на беспорядочно возникающей пульсации и минимизации [175]. В методе Г. Чанга и соавт. [176], принципиально не отличающемся от упомянутых выше, деформация затрагивает двугранные углы, а локальная минимизация энергии выполняется в декартовых координатах при полностью лабильной геометрии молекулы. Проверка процедуры, включающей большие деформации с одновременной минимизацией, была проведена на циклогептадекане и дала удовлетворительные результаты [177]. Лишь недавно она была использована в конформационном анализе олигопептидов [178].

Усовершенствование рассматриваемой процедуры направлено на уменьшение полного произвола в выборе новой деформации. С этой целью в работах Г. Шераги и соавторов были привлечены метод самосогласованного электрического поля [179–181] и поляризационный метод ориентации диполей различных частей молекулы [182]. В обоих случаях предпочтение отдается выбору, ведущему к уменьшению энергии электростатических взаимодействий. Р. Абагян и М. Тотров, стремясь к тому же, используют функции распределения конформационных точек белков, трехмерные структуры которых известны, в пространстве ϕ - ψ и χ [183].

Метод деформации с одновременной минимизацией энергии, как и любой из существующих методов конформационного анализа пептидов и белков, не в состоянии количественно оценить всевозможные структурные варианты сложного объекта, составленные из предпочтительных по энергии форм свободных аминокислотных остатков. Более того, и это также является принципиальным недостатком, метод не обеспечивает объективный контроль получаемых результатов и не гарантирует от пропуска перспективных для последующего расчета конформаций. Его существенное ограничение состоит в быстром увеличении компьютерного времени с усложнением системы; так необходимое для каждой локальной оптимизации время увеличивается по меньшей мере квадратично росту переменных; одновременно возрастает число шагов и число итераций каждого шага [136].

Метод температурного "отжига". Подход достаточно универсален и может быть использован при изучении самых разнообразных проблем, связанных с оптимизацией. Расчет системы начинается с процедуры Монте Карло при повышенной температуре и затем воспроизводится при более низких. График охлаждения – важнейший элемент данного метода. Если он выполняется соответствующим образом, то исследуемая система (в нашем случае, конформационно лабильный пептид), постепенно "замо-

раживаясь", принимает состояние, отвечающее самой низкой энергии (т.е. глобальной трехмерной структуры) [184–187]. Присущий методу недостаток состоит в крайней чувствительности конечного результата к графику охлаждения. И хотя при рассмотрении некоторых проблем, связанных с минимизацией, и были найдены удовлетворительные решения [188], тем не менее выбор оптимального режима понижения температуры, как правило, является делом "проб и ошибок".

Техника "отжига" в конформационном анализе пептидов и белков часто используется в комбинации с методом молекулярной динамики, в котором температура вводится в расчет посредством кинетической энергии. Самый простой и наиболее распространенный алгоритм этого метода был предложен Х. Берендсеном и соавт. [189]. Сравнение его с другими алгоритмами метода молекулярной динамики выполнено в работе [190]. Комбинированный метод динамического "отжига" применяется в анализе более или менее сложных пептидов, однако непременно с использованием экспериментальных ограничений, получаемых от рентгеноструктурной кристаллографии и ЯМР [191–194]. Расчет, таким образом, сводится к уточнению уже известной структуры или выбору из небольшого числа предполагаемых вариантов. В разработанном М.Сноу подходе привлекаются данные о гомологии белков [195, 196]. Метод "отжига" широко используется, правда с переменным успехом, в конформационном анализе простых пептидов [197–200], причем наиболее популярным объектом является энкефалин, конформационно достаточно простой эндогенный пентапептид, содержащий два остатка Gly [200–206]. Дж. Хиго и соавт. [207] предложили процедуру длительного "отжига" в комбинации с методом взвешенного набора переменных [208] и минимизацией энергии по вторым производным, позволяющим судить об анизотропии потенциальной поверхности. Авторы использовали процедуру для расчета конформационных состояний пептидных петель в белках, структуры которых известны [209].

Метод статистической информации. Это целое семейство процедур, в которых для отбора конформаций, служащих исходными приближениями в последующем расчете, используется разного рода вероятностная информация. Ее источником может быть банк данных белковых структур, статистическое распределение остатков на конформационных картах Φ – Ψ усредненная предпочтительность парных остаток-остаточных контактов или алгоритмы предсказаний вторичных структур [210–216]. Очевидно, данные такого рода ориентировочны и могут скорее ввести в заблуждение, чем помочь в решении структурной проблемы пептидов и тем более белков. Конформационные возможности каждого из них определяются не статистикой, а определенной и всегда уникальной аминокислотной последовательностью. Показательно в этом отношении исследование М. Ламберта и Г. Шераги [210–212] панкреатического полипептида из 36 остатков. В расчет его структуры в качестве дополнительной вероятностной информации привносятся данные о распределении значений двугранных углов основной цепи в четырех областях конформационной карты Φ – Ψ и распределении конформационных состояний трипептидных сегментов на нерегулярных участках трехмерных структур белков, изученных кристаллографически. Набор исходных для оптими-

ции приближений формируется с N-конца путем генерации наиболее вероятных конформаций перекрывающихся трипептидов до тех пор, пока число структурных вариантов основной цепи полипептида не достигнет тысячи. Затем их энергия подвергается стандартной процедуре минимизации при варьировании торсионных углов. Структура исследованной Шамбертом и Шерагой молекулы была заранее известна; она состоит из двух неправильных спиралей, расположенных визави. Успех предсказания, который сами авторы считают относительным, заключается в грубоориентировочной локализации участка β -изгиба и положения одной спирали. М. Васкес, Г. Немети и Г. Шерага, анализируя возможности метода с привлечением статистической информации, замечают, что "...он не может быть полезным в отсутствие сведений о дальних взаимодействиях" [136, С. 2196], иными словами, без знания трехмерных структур.

Попытки получить информацию о дальних взаимодействиях с помощью эмпирических корреляций предпринимаются уже в течение последних двух десятилетий [217–219]. До сих пор удовлетворительные результаты не были получены даже для ограниченной части белков, пространственное строение которых можно грубо представить в виде комбинаций α -спиралей и β -складчатых листов. Такая оценка основывается, в частности, на результатах предсказаний трехмерных структур интерлейкина-2, гормона роста и интерлейкина-4 [214, 220, 221]. Для первых двух белков отсутствует совпадение как в предсказанных и наблюдаемых положениях α -спиралей, так и в характере их взаимодействия. Для третьего белка положения четырех α -спиралей идентифицированы более удовлетворительно, однако их взаимное расположение предсказано с точностью до наоборот (указана закрутка супервторичной структуры, противоположная наблюдаемой [215, 222–225]).

К новым методам теоретического конформационного анализа пептидов и белков, предложенным и опробованным в исследованиях конкретных объектов, можно добавить еще несколько процедур поиска глобальных пространственных форм. Например, разработанный Г. Криппеном метод так называемых энергетических вставок, который основан на деформации потенциальной поверхности, ведущей к постепенному исчезновению высокоэнергетических минимумов [226–228]. Аналогичная процедура была позднее предложена Е. Пурисимой и Г. Шерагой [229]. Метод деформации потенциальной поверхности в комбинации с методом молекулярной динамики и с привлечением экспериментальных данных ЯМР был использован в расчете ряда пептидов [230–232]. Л. Пиела и соавторы разработали метод диффузионного сглаживания потенциальной поверхности [233] и применили его в расчете оптимальных конформаций Met-энкефалина [234, 235]. Найденная при этом глобальная структура пентапептида удовлетворительно совпала с геометрией самой низкоэнергетической формы, рассчитанной методом Монте Карло минимизации [171, 172].

В связи с развитием генной инженерии, сделавшей доступными гутантные белки, в последние годы более популярными становятся расчетные методы, основанные на предположении о существовании аналогии между биологической эволюцией и процессом оптимизации. При этом руководящей является идея об эволюции целой структурной попу-

ляции данного белка, а не идея единственной для него конформационной "траектории", т.е. трансформации одной структуры [236]. Методы были применены в расчетах грубых моделей пептидов и белков [237, 238], упрощенных непрерывных полипептидных цепей [239–242], моделей с фиксированным скелетом и заменяемыми боковыми цепями [243]; рассматривались также другие модели [244, 245]. Описание имеющихся генетических конформационных алгоритмов содержится в монографии Д. Голдберга [236] и обзоре С. Форреста [246].

В представленном в этом разделе кратком описании расчетных методов нашли отражение основные тенденции развития конформационного анализа пептидов и белков в последнее время. Несмотря на многочисленность и видимое разнообразие новых теоретических разработок, их сближает ряд общих черт принципиального характера, причем тех же самых, что были присущи предшествующим теоретико-методологическим исследованиям. Отмечу лишь три таких особенности. Во-первых, практически все предложенные методы расчета исходят из предположения, что нативная трехмерная структура белка имеет самую низкую внутреннюю энергию. Поэтому конечная цель каждого метода состоит в установлении глобальной конформации молекулы по известной аминокислотной последовательности. Такое предположение, сформулированное более 40 лет назад, до сих пор не встретило каких-либо противоречий со стороны экспериментальных фактов и, следовательно, может считаться оправданным. Во-вторых, в последние годы, как и ранее, во всех случаях предпринимались попытки подойти к расчету глобальной конформации белка путем усовершенствования предсказательных алгоритмов, процедур минимизации и вычислительной техники. Надежды на решение структурной проблемы по-прежнему связываются не с более глубоким проникновением в молекулярную физику белка и разработкой соответствующих теорий, а главным образом с достижением в области методологии теоретического конформационного анализа и развитием компьютерной аппаратуры. Между тем такой подход в принципе не может привести к априорному расчету глобальной конформации белка. В разделе 2.1 уже указывалось, что перебор со скоростью вращательной флуктуации (10^{-14} с) всех мыслимых конформационных состояний даже у низкомолекулярной белковой цепи (< 100 остатков) занял бы не менее 10^{50} лет. Следовательно, при беспорядочно-поисковом механизме сборки белка как в условиях *in vivo* в процессе рибосомного синтеза, так и в условиях *in vitro* в процессе ренатурации не может осуществляться через селекцию конформации всех локальных минимумов потенциальной поверхности. Реальные же возможности самых совершенных современных методов расчета ограничены независимым анализом тетра- и пентапептидов, рассчитанных четверть века назад. Ни один из существующих теоретических методов не в состоянии проводить конформационный анализ сложных олигопептидов, а тем более белков, без привлечения дополнительной информации – результатов прямого эксперимента, касающегося исследуемого объекта, или статистической обработки имеющихся структурных данных. В-третьих для всех предложенных методов расчета характерно отсутствие классификации пептидных структур, оправданной с физической точки зрения и

охватывающей все возможные состояния. Поэтому каждая конформация рассчитывается вне связи с другими структурными вариантами, количество которых часто составляет десятки, а то и сотни тысяч. Если нет классификации столь больших массивов данных, то не может быть и детального анализа получаемых результатов и, следовательно, выявления факторов, ответственных за стабилизацию пространственного строения исследуемых аминокислотных последовательностей. Велика также в этом случае вероятность случайных пропусков актуальных конформаций.

* * *

В разделах 7.1 и 7.2 изложен метод, на сегодняшний день единственный, в котором предпринята попытка обойти проблему множественности энергетических минимумов (не решаемую для белка ни человеком, ни природой) и в то же время сохранить априорность расчета, т.е. использовать только знание аминокислотной последовательности [14, 106, 247]. Доказательству справедливости исходных положений метода и выяснению его возможностей в расчете оптимальных конформационных состояний пептидов и белков посвящена большая часть глав этой книги. Настоящий раздел завершается описанием тех, наиболее характерных для него и отсутствующих у других методов особенностей, которые позволили предпринять строго теоретическое исследование пространственного строения сложных олигопептидов и низкомолекулярных белков.

Теоретической основой метода априорного расчета глобальных конформаций являются представление о механизме свертывания белковой цепи как о нелинейном неравновесном процессе, обусловленном и направляемом необратимыми флуктуациями (бифуркационная теория самосборки белка) (см. разд. 2.1) и представление о нативной конформации белка как о плотно упакованной структуре, обладающей минимальной внутренней энергией и согласованной в отношении всех внутриостаточных и межостаточных взаимодействий валентно-несвязанных атомов белковой молекулы (физическая теория структурной организации белка) (см. разд. 2.2).

Согласно теории бифуркаций, переход цепи из состояния статистического клубка в строго детерминированную трехмерную структуру начинается с практически одновременного появления на разных участках последовательности независимых друг от друга необратимых флуктуаций. Первый этап структурирования таким образом включает немногочисленный ряд параллельно идущих независимых процессов формообразования как бы несвязанных друг с другом отдельных фрагментов. Чтобы процессы могли совершаться действительно независимо, необходимо предположить конформационную гетерогенность природных аминокислотных последовательностей – чередование в белковой цепи структурно жестких и лабильных участков. Первые обладают способностью под действием ближних и средних взаимодействий входящих в них остатков свертываться в определенные структуры, которые существенно не изменяются на последующих этапах сборки, а вторые – промежуточные участки, пока остаются подвижными, хотя и их конформационная свобода ограничивается ближними и средними взаимодействиями. Чтобы свертывание

локальных участков наверняка имело бы место и происходило при беспорядочно-поисковом механизме за короткое время (10^{-3} – 10^{-1} с), их размер не должен превышать 10–12 остатков.

Дифференциация свертывающейся цепи на конформационно жесткие и лабильные фрагменты является поворотным моментом, определяющим направленность и характер дальнейшего развития процесса. Впоследствии также за счет случайно возникших флуктуаций в специфические взаимодействия вовлекаются удаленные по цепи остатки из разных ее участков, и белок переходит во второе промежуточное состояние. Структурирование, вызванное новым набором согласованных необратимых флуктуаций, осуществляется за счет сближенности комплементарных и избирательно взаимодействующих конформационно жестких и лабильных фрагментов, т.е. за счет дальних взаимодействий. Быстрое появление соответствующих необратимых флуктуаций здесь также неизбежно, поскольку увеличение количества взаимодействующих между собой остатков сопровождается уменьшением конформационных степеней свободы.

Таким образом, согласно бифуркационной теории, ни один из этапов механизма спонтанного свертывания белка, включая окончательное построение его биологически активной трехмерной структуры, не содержит селекции практически бесконечного множества мыслимых конформационных состояний аминокислотной последовательности. Следовательно, если описанный механизм адекватен реальному процессу, т.е. если бифуркационная теория верна, то разработанный на ее основе метод расчета вообще не встречается с проблемой поиска глобального минимума энергии на многомерной потенциальной поверхности. Содержание конформационного анализа в этом случае распадается на две также непростые задачи. Одна из них заключается в оптимизации составляющих белковую цепь олигопептидных участков в их свободном состоянии при вариации всех возможных комбинаций значений двугранных углов вращения каждого отдельного фрагмента. Цель решения этой задачи состоит в идентификации конформационно жестких и лабильных участков аминокислотной поверхности. Вторая задача включает анализ невалентных взаимодействий тех и других и многоступенчатую минимизацию энергии с постепенным увеличением длины цепи и раскрепощением конформационных параметров жестких участков. В конечном счете будет получена количественная оценка конформационных возможностей всей белковой молекулы и выявлена ее глобальная нативная трехмерная структура. Этот вывод справедлив, однако, лишь в принципе, а реально ни та, ни другая задача не поддаются решению без введения дополнительных положений о структурной организации нативной конформации белка. Предоставленная бифуркационной теорией возможность перехода от расчета целой белковой цепи к расчету отдельных фрагментов и далее анализу комбинаций их пространственных форм в огромной степени упростила проблему, но не сделала ее практически разрешимой. Причина та же – множественность локальных минимумов энергии на потенциальной поверхности, правда, теперь уже не всей белковой цепи, а ее конформационно жестких и лабильных участков, которые могут состоять из 10–12 аминокислотных остатков. Как известно, независимому и строгому анализу поддаются

пептиды, длина которых не превышает 4–5 остатков. Уже их расчет требует минимизации порядка 10^6 исходных приближений, что исключает возможность исследования конформационной гетерогенности аминокислотной последовательности и определения жестких и лабильных фрагментов.

Второй идейной основой метода конформационного анализа пептидов и белков явилась физическая теория их структурной организации. Основные положения теории, с одной стороны, представляют собой следствия бифуркационной теории свертывания белковой цепи, а с другой, отражают свойства, присущие нативным конформациям всех белков. Постулированные в теории предпочительность внутримолекулярных взаимодействий аминокислотной последовательности перед ее взаимодействиями с молекулами растворителя и согласованность между всеми внутриостаточными (ближними) и межостаточными (средними и дальними) взаимодействиями открыли принципиальную возможность для поэтапного подхода к решению обсуждаемой проблемы (см. разд. 2.2). Доказательство справедливости теории бифуркаций и физической теории структурной организации пептидов и белков, в частности, предположения о согласованности в нативном состоянии молекул всех ближних и дальних взаимодействий валентно-несвязанных атомов есть главная, решаемая в последующих главах, задача этой книги. Сейчас лишь отметим, что рассмотренные выше результаты независимых расчетов оптимальных конформаций множества моно-, ди- и трипептидов не вступили в противоречие с имеющимися экспериментальными данными и сделанными предположениями о механизме сборки и структурной организации белка.

Особенно важными для опробовки термодинамической и физической теорий и созданного на их основе расчетного метода оказались следующие два результата конформационного анализа простейших пептидов. Во-первых, было обнаружено, что конформационные возможности аминокислотных остатков в белках почти полностью определяются ближними взаимодействиями. Влияние даже смежных по цепи остатков не ведет к повышению энергии, а проявляется лишь в характере распределения конформационных опытных значений двугранных углов ϕ , ψ в пределах низкоэнергетических областей потенциальных поверхностей изолированных молекул метиламидов N-ацетил- α -аминокислот. Впервые это было установлено Е.М. Поповым и Г.М. Липкиным в 1971 г. [108, 109]. Во-вторых, проведенный анализ позволил сделать заключение о разном характере и противоположной направленности ближних взаимодействий, с одной стороны, и средних и дальних взаимодействий, с другой. Первые могут проявляться только на небольших расстояниях между валентно-несвязанными атомами, чаще всего соответствующих области их отталкивания. Энергия этих взаимодействий возрастает с уменьшением расстояния пропорционально $\sim r^{-12}$. Если в пределах остатка и возникают дисперсионные, притягивающие атомы друг к другу взаимодействия, то их энергетический вклад не может диктовать выбор конформационного состояния, поскольку таких контактов мало, а минимумы каждого из них на отрицательной ветви потенциальной кривой, как известно, неглубоки ($\sim 0,1$ ккал/моль) (см. рис. I.2 и I.3). Кроме того, энергия дисперсионных взаимодействий изменяется пропорционально $\sim r^{-6}$, т.е. несравненно мягче

изменения энергии отталкивания. Влияние средних и дальних невалентных взаимодействий аналогично по своей природе и направленности влиянию растворителя, который может сместить положение конформационного равновесия в наборе низкоэнергетических по ближним (внутримолекулярным) взаимодействиям пространственных форм, но не может сформировать новую конформацию растворенной молекулы, не согласованную с мощными силами отталкивания. Тем самым обосновывается предположение о гармонии всех видов невалентных взаимодействий атомов в структурной организации молекул пептидов и белков. Последующее изложение многократно подтвердит этот тезис.

Наконец, следует отметить еще одну важную особенность рассматриваемого метода конформационного анализа. Она явилась прямым результатом исследования простейших пептидов и заключается в создании структурной классификации аминокислотных последовательностей, охватывающей все многообразие пространственных форм и обоснованной экспериментально и теоретически. Главная ценность разделения пептидных структур на конформации, формы и шейпы состоит во впервые появившейся возможности перейти от необходимости анализа всех комбинаций низкоэнергетических конформаций свободных аминокислотных остатков, образующих данный пептид (их количество превышает 10^n , где n – число остатков в цепи), к анализу отдельных представителей, дающих объективную информацию о конформационных вариантах больших таксономических групп.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kurland R.J., Wilson E.B. // J. Chem. Phys. 1957. Vol. 27. P. 585–592.
2. Costain C.C., Dowling J.M. // Ibid. 1960. Vol. 32. P. 158–165.
3. Davies M., Evans J.C. // Ibid. 1952. Vol. 20. P. 342–351.
4. Ladell J., Post B. // Acta crystallogr. 1954. Vol. 7. P. 559–564.
5. Kimura M., Aoki M. // Bull. Chem. Soc. Jap. 1953. Vol. 26. P. 429–434.
6. Senti F., Harker D. // J. Amer. Chem. Soc. 1940. Vol. 62. P. 2009–2019.
7. Katz J.L., Post B. // Acta crystallogr. 1960. Vol. 13. P. 624–629.
8. Lide D.R. // J. Chem. Phys. 1957. Vol. 27. P. 343–352.
9. Swallen J.D., Costain C.C. // Ibid. 1959. Vol. 31. P. 1562–1574.
10. Curl R.F. // Ibid. Vol. 30. P. 1529–1532.
11. Попов Е.М., Коган Г.А., Желтова В.Н. // Теорет. и эксперим. химия. 1970. Т. 6. С. 14–30.
12. Иванов В.И., Костецкий П.В., Балашиха Т.А. и др. // Химия природных соединений. 1973. № 3. С. 339–348.
13. Попов Е.М., Липкинд Г.М., Архипова С.Ф. // Молекуляр. биология. 1971. Т. 2. С. 312–316.
14. Попов Е.М. Структурная организация белков. М.: Наука, 1989.
15. Levitt M., Lifson S. // J. Mol. Biol. 1969. Vol. 46. P. 269–279.
16. Drieschner J., Steigemann W. // Acta crystallogr. B. 1975. Vol. 31. P. 238–250.
17. Антонов В.К. Химия протеолиза. М.: Наука, 1991.
18. Piercy J.E., Subrahmanyam S.V. // J. Chem. Phys. 1965. Vol. 42. P. 1475–1480.
19. Попов Е.М., Плетнев В.З., Липкинд Г.М., Архипова С.Ф. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1971. № 1. С. 33–40.
20. Попов Е.М., Дашевский В.Г., Липкинд Г.М., Архипова С.Ф. // Молекуляр. биология. 1968. Т. 2. С. 612–621.
21. Tabor W.J. // J. Chem. Phys. 1957. Vol. 27. P. 974–978.
22. Basch H., Robin M.B., Kuebler N.A. // Ibid. 1967. Vol. 47. P. 1201–1210.

23. Poland D., Scheraga H.A. // Biochemistry. 1967. Vol. 6. P. 3791–3800.
24. Попов Е.М., Желтова В.Н. // Журн. прикл. спектроскопии. 1970. Т. 14. С. 122–128.
25. Попов Е.М., Желтова В.Н. // Там же. С. 1046–1052.
26. Коулсон Ч. Валентность. М.: Мир, 1965.
27. Попов Е.М., Желтова В.Н., Коган Г.А. // Журн. структур. химии. 1970. Т. 11. С. 1053–1060.
28. Попов Е.М., Желтова В.Н., Коган Г.А. // Там же. 1969. Т. 10. С. 1119–1122.
29. Попов Е.М., Желтова В.Н., Коган Г.А. // Там же. 1970. Т. 11. С. 149–151.
30. Эпштейн Л.М., Попова Е.М. // Оптика и спектроскопия. 1967. Т. 22. С. 903–911.
31. Эпштейн Л.М. // Журн. структур. химии. 1967. Т. 8. С. 273–278.
32. Попов Е.М., Яковлев И.П. // Там же. 1968. Т. 9. С. 54–61.
33. Попов Е.М., Коган Г.А. // Успехи химии. 1968. Т. 37. С. 256–295.
34. Попов Е.М., Коган Г.А., Стручкова М.И., Желтова В.Н. // Журн. структур. химии. 1971. Т. 12. С. 61–66.
35. Попов Е.М., Коган Г.А. // Там же. 1967. Т. 8. С. 476–484.
36. Попов Е.М. // Там же. С. 640–646.
37. Попов Е.М. Структурно-функциональная организация белков. М.: Наука, 1992.
38. Bradbury E.M., Elliott A. // Spectrochim. acta. 1963. Vol. 19. P. 995–1004.
39. Jakes J., Scheider B. // Coll. Czechosl. Chem. Commun. 1968. Vol. 33. P. 643–652.
40. Pauling L. The nature of the chemical bond. 3rd ed. Ithaca (N.Y): Cornell Univ. press, 1962.
41. Homer R.B., Johnson C.D. // The chemistry of amides / Ed. J. Zabicky. L.: Wiley, 1970. P. 187–243.
42. Hine J., Hine M. // J. Amer. Chem. Soc. 1952. Vol. 74. P. 5266–5271.
43. Carlsen N.R., Radom L., Riggs N.V., Rodwell W.R. // Ibid. 1979. Vol. 101. P. 2233–2234.
44. Christensen D.H., Kortzeborn R.N., Bak B., Led J.J. // J. Chem. Phys. 1970. Vol. 53. P. 3912–3922.
45. Van J.F., Momany F.A., Hoffmann R., Scheraga H.A. // J. Phys. Chem. 1970. Vol. 74. P. 420–433.
46. Lifson S., Hadler A.T., Dauber P. // J. Amer. Chem. Soc. 1979. Vol. 101. P. 5111–5121.
47. Эпштейн Л.М., Попов Е.М. // Теорет. и эксперим. химия. 1967. Т. 3. С. 407–409.
48. Labarre J.F. // C. r. Acad. sci. C. 1962. Vol. 255. P. 2579–2583.
49. Castan P., Labarre J.F. // Ibid. 1966. Vol. 262. P. 80–87.
50. Costain C.C., Morton J.M. // J. Chem. Phys. 1959. Vol. 31. P. 389–394.
51. Рао Ч.Н.Р. Электронные спектры в химии. М.: Мир, 1964.
52. Oshima H. // Bull. Chem. Soc. Jap. 1961. Vol. 34. P. 846–852.
53. Barnes E.E., Simpson W.T. // J. Chem. Phys. 1963. Vol. 39. P. 670–677.
54. Hayes W.P., Timmons C.J. // Spectrochim. acta. 1965. Vol. 21. P. 529–532.
55. Peterson D.L., Simpson W.T. // J. Amer. Chem. Soc. 1957. Vol. 79. P. 2375–2379.
56. Closson W.D., Haug P. // Ibid. 1964. Vol. 86. P. 2384–2388.
57. Mayani M.F., Al-Taiar A.H., Al-Baldawi S.A., Hussian H.A. // Canad. J. Chem. 1966. Vol. 44. P. 2218–2230.
58. Ramachandran G.N., Ramakrishnan C., Sasisekharan V. // J. Mol. Biol. 1963. Vol. 7. P. 75–102.
59. Pauling L., Cory R.B. // J. Amer. Chem. Soc. 1950. Vol. 72. P. 5349.
60. Pauling L., Cory R.B. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1951. Vol. 37. P. 205–285.
61. De Santis P., Giglio E., Liquori A.M., Ripamonti A. // Nature. 1965. Vol. 206. P. 456–460.
62. Brant D.A., Flory P.J. // J. Amer. Chem. Soc. 1965. Vol. 87. P. 2791–2799.
63. Leach S., Nemethy G., Scheraga H.A. // Biopolymers. 1966. Vol. 4. P. 368–386.
64. Leach S., Nemethy G., Scheraga H.A. // Ibid. P. 387–399.
65. Scott R.A., Scheraga H.A. // J. Chem. Phys. 1966. Vol. 45. P. 2091–2101.
66. Ooi T., Scott R.A., Vanderkoi G., Scheraga H.A. // Ibid. 1967. Vol. 46. P. 4410–4425.
67. Попов Е.М., Липкинд Г.М., Архипова С.Ф., Дашевский В.Г. // Молекуляр. биология. 1968. Т. 2. С. 622–630.
68. Mizushima S., Shimanouchi T. // Adv. Enzymol. 1961. Vol. 23. P. 1–130.
69. Huggins M.L. // Annu. Rev. Biochem. 1942. Vol. 11. P. 27–50.
70. Avignon M., Huong P.V., Lascombe J. // Biopolymers. 1969. Vol. 8. P. 69–89.
71. Marrand M., Neel J., Avignon M., Huong P.V. // J. Chem. Phys. 1970. Vol. 67. P. 959–964.
72. Avignon M., Huong P.V. // Biopolymers. 1970. Vol. 9. P. 427–432.
73. Cung M.T., Marrand M., Neel J., Aubry A. // Ibid. 1978. Vol. 17. P. 1149–1173.

74. *Stimson E.R., Zimmerman S.S., Scheraga H.A.* // *Macromolecules*. 1977. Vol. 10. P. 1049–1060.
75. *Maxfield F.R., Leach S.J., Stimpson E.R.* et al. // *Biopolymers*. 1979. Vol. 18. P. 2507–2521.
76. *Rao C.P., Balaram P., Rao C.N.R.* // *Ibid.* 1983. Vol. 22. P. 2091–2104.
77. *Banekar J., Krimm S.* // *Intern. J. Peptide and Protein Res.* 1985. Vol. 26. P. 407–415.
78. *Cung M.T., Marrand M., Neel J.* // *Biopolymers*. 1976. Vol. 15. P. 2081–2095.
79. *Boussard G., Marrand M.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1985. Vol. 107. P. 1825–1828.
80. *Mizuno K., Niship S., Shindo Y.* // *Biopolymers*. 1979. Vol. 18. p. 693–708.
81. *Smolikova J., Pospisek J., Blaha K.* // *Coll. Czechosl. Chem. Commun.* 1981. Vol. 46. P. 772–780.
82. *Boussard G., Marrand M.* // *Biopolymers*. 1979. Vol. 18. P. 1297–1331.
83. *Липкинд Г.М., Архипова С.Ф., Попов Е.М.* // *Журн. структур. химии*. 1970. Т. 11. С. 121–126.
84. *Schellman J.A.* // *C. r. trav. lab. Carlsberg. Ser. chim.* 1955. Vol. 29. P. 223–230.
85. *Klotz T.M., Fransen I.S.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1962. Vol. 84. P. 3461–3465.
86. *Krimm S., Mark J.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1968. Vol. 60. P. 1122–1131.
87. *Портнова С.Л., Быстров В.Ф.* // *Журн. общ. химии*. 1968. Т. 38. С. 428–435.
88. *Ефремов Е.С., Сенявина Л.Б., Желтова В.Н.* и др. // *Химия природ. соединений*. 1973. № 3. С. 322–378.
89. *Попов Е.М., Липкинд Г.М., Архипова С.Ф.* // *Изв. АН СССР. Сер. хим.* 1971. № 2. С. 312–319.
90. *Mizushima S., Shimanouchi T., Tsuboi M., Arakawa T.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1957. Vol. 79. P. 5357–5363.
91. *Urry D.W.* // *Annu. Rev. Phys. Chem.* 1968. Vol. 19. P. 477–530.
92. *Frenrich E.U., Andreatta R.H., Scheraga H.A.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1970. Vol. 92. P. 1116–1122.
93. *Quadrioglio F., Urry D.W.* // *Ibid.* 1968. Vol. 90. P. 2755–2761.
94. *Bayley P.M., Nielsen E.B., Schellman J.A.* // *J. Phys. Chem.* 1969. Vol. 73. P. 228–234.
95. *Goodman M., Fried M.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1967. Vol. 89. P. 1264–1268.
96. *Madison V., Schellman J.* // *Biopolymers*. 1970. Vol. 9. P. 569–573.
97. *Go N., Scheraga H.A.* // *Macromolecules*. 1970. Vol. 3. P. 178–184.
98. *Maigret B., Parahia D., Pullman B.* // *J. Theor. Biol.* 1970. Vol. 29. P. 275–287.
99. *Липкинд Г.М., Архипова С.Ф., Попов Е.М.* // *Изв. АН СССР. Сер. хим.* 1970. № 2. С. 315–322.
100. *Портнова С.Л., Быстров В.Ф., Балашева Т.А.* и др. // *Тез. II Всесоюз. симпоз. по химии пептидов*. Душанбе: Дониш, 1969.
101. *Пиментел Дж., Мак-Келлан О.* *Водородная связь*. М.: Мир, 1964.
102. *Гурская Г.В.* *Структура аминокислот*. М.: Наука, 1966.
103. *Hughes E.W., Moore W.J.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1949. Vol. 71. P. 2618–2622.
104. *Липкинд Г.М., Архипова С.Ф., Будковская В.Н., Попов Е.М.* // *Молекуляр. биология*. 1974. Т. 8. С. 902–912.
105. *Попов Е.М.* // *Там же*. 1975. Т. 9. С. 578–593.
106. *Ропов Е.М.* // *Intern. J. Quant. Chem.* 1979. N 16. P. 707–737.
107. *Попов Е.М.* // *Физика молекул*. Киев: Наук. думка, 1980. Вып. 8. С. 69–113.
108. *Попов Е.М., Липкинд Г.М.* // *Молекуляр. биология*. 1971. Т. 5. С. 624–636.
109. *Липкинд Г.М., Попов Е.М.* // *Там же*. С. 667–679.
110. *Липкинд Г.М., Архипова С.Ф., Попов Е.М.* // *Там же*. 1970. Т. 4. С. 331–338.
111. *Липкинд Г.М., Архипова С.Ф., Попов Е.М.* // *Там же*. С. 509–516.
112. *Bohak Z., Katchalsky E.* // *Biochemistry*. 1963. Vol. 2. P. 228–232.
113. *Kreissler M.A., Achmedov N.A., Arkhipova S.F.* et al. // *J. chim. phys.* 1974. Vol. 71. P. 913–919.
114. *Wei Ch.H., Doherty D.G.* // *Acta crystallogr. B*. 1972. Vol. 28. P. 907–911.
115. *Попов Е.М., Ахмедов Н.А., Липкинд Г.М.* // *Биооргани. химия*. 1975. Т. 1. С. 1268–1290.
116. *Kreissler M.A., Lipkind G.M., Arkhipova S.F., Popov E.M.* // *J. chim. phys.* 1973. Vol. 70. P. 1371–1378.
117. *Kreissler M.A., Arkhipova S.F., Lipkind G.M., Popov E.M.* // *Ibid.* 1974. Vol. 71. P. 907–912.
118. *Pletnev V.Z., Kadymova F.A., Popov E.M.* // *Biopolymers*. 1974. Vol. 13. P. 1085–1092.
119. *Липкинд Г.М., Ахмедов Н.А., Попов Е.М.* // *Биооргани. химия*. 1975. Т. 1. С. 1280–1290.

120. Максумов И.С., Архипова С.Ф., Липкинд Г.М., Попов Е.М. // Химия природ. соединений. 1975. № 2. С. 211–219.
121. Плетнев В.З., Кадымова Ф.А., Попов Е.М. // Там же. № 5. С. 631–637.
122. Жоров Б.С., Попов Е.М., Говырин В.А. // Молекуляр. биология. 1975. Т. 9. С. 415–425.
123. Жоров Б.С., Попов Е.М., Говырин В.А. // Там же. С. 710–715.
124. Ахмедов Н.А., Липкинд Г.М., Мельников П.Н., Попов Е.М. // Биоорган. химия. 1976. Т. 2. С. 746–761.
125. Lipkind G.M., Arkhipova S.F., Popov E.M. // J. Peptide and Protein Res. 1973. Vol. 5. P. 1371–1378.
126. Shimanouchi T., Mizushima S. // J. Chem. Phys. 1955. Vol. 23. P. 707–711.
127. Грибов Л.А., Лазарев Ю.В., Ховрин Г.В. // Журн. структур. химии. 1972. Т. 13. С. 536–541.
128. Математическое обеспечение ЕС ЭВМ / Ин-т математики АН БССР. 1978. Вып. 17. С. 48–77.
129. Ломизе А.Л., Попов Е.М. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. С. 1474–1485.
130. Ломизе А.Л., Попов Е.М. // Молекуляр. биология. 1983. Т. 17. С. 1212–1220.
131. Плетнев В.З., Громов Э.П., Кадымова Ф.А. // Журн. структур. химии. 1975. Т. 16. С. 165–168.
132. Попов Е.М., Демин В.В., Шибанова Е.Д. Проблема белка. Т. 2. Пространственное строение белка. М.: Наука, 1996.
133. Anfinsen C.B., Scheraga H.A. // Adv. Protein Chem. 1975. Vol. 29. P. 205–300.
134. Nemethy G., Scheraga H.A. // Quart. Rev. Biophys. 1977. Vol. 10. P. 239–352.
135. Karplus M., Petsko G.A. // Nature. 1990. Vol. 347. P. 631–639.
136. Vasquez M., Nemethy G., Scheraga H.A. // Chem. Rev. 1994. Vol. 94. P. 2183–2239.
137. Lumry R., Eyring H. // J. Phys. Chem., 1954. Vol. 58. P. 110–115.
138. Anfinsen C.B. // Science. 1973. Vol. 181. P. 223–230.
139. Levinthal C. // J. Chem. Phys. 1968. Vol. 65. P. 44–49.
140. Wetlaufer D.B., Ristow S. // Annu. Rev. Biochem. 1973. Vol. 42. P. 135–201.
141. Бауэр Э.С. Теоретическая биология. М.; Л.: ВИЭМ, 1935.
142. Eyring H., Lumry R., Spikes J. Mechanisms of enzyme action. Baltimore: J. Hopkins Univ. press, 1954.
143. Jencks W.P. // Current aspects of biochemical energetics. N.Y.: Acad. press, 1996. P. 273–300.
144. Koshland D.E. // Adv. Enzymol. 1960. Vol. 22. P. 45–97.
145. Волькенштейн М.В. Физика ферментов. М.: Наука, 1967.
146. Хургин Ю.И., Чернавский Д.С., Шноль С.Э. // Молекуляр. биология. 1967. Т. 1. С. 419–424.
147. Блюменфельд Л.А. Проблемы биологической физики. М.: Наука, 1974.
148. Клесов А.А., Березин И.В. Ферментативный катализ. М.: Изд-во МГУ, 1980.
149. Фершт Э. Структура и механизм действия ферментов. М.: Мир, 1980.
150. Zwanzig R., Szabo A., Bagchi B. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1992. Vol. 89. P. 20–24.
151. Skolnick J., Kolinski A. // Science. 1990. Vol. 250. P. 1121–1126.
152. Gibson K.D., Scheraga H.A. // Structure and expression: from proteins to ribosomes / Ed. R.H. Sarma, M.H. Sarma. Guilderland: Adenine press, 1988. Vol. 1. P. 67–150.
153. Scheraga H.A. // Reviews in computational chemistry / Ed. K.B. Lipkowitz, D.B. Boyd. N.Y.: VCH Publ. 1992. Vol. 3. P. 73–192.
154. Vasquez M., Scheraga H.A. // Biopolymers. 1985. Vol. 24. P. 1437–1447.
155. Gibson K.D., Scheraga H.A. // J. Comput. Chem. 1987. Vol. 8. P. 826–830.
156. Pincus M.R. // Biopolymers. 1992. Vol. 32. P. 347–358.
157. Vajda S., Kataoka R., De Lisi C. et al. // Annu. Rev. Biophys. and Bioeng. 1990. Vol. 19. P. 69–87.
158. Vajda S., De Lisi C. // Biopolymers. 1990. Vol. 29. P. 1755–1772.
159. Dammkoehler R.A., Karasek S.F., Shands E.F.B., Marshall G.R. // J. Comput. Aided Mol. Des. 1989. Vol. 3. P. 3–7.
160. Beusen D.D., Iijima H., Marshall G.R. // Biochem. Pharmacol. 1990. Vol. 40. P. 173–180.
161. Vasquez M., Scheraga H.A. // J. Biomol. Struct. Dyn. 1988. Vol. 5. P. 705–756.
162. Vasquez M., Scheraga H.A. // Ibid. P. 757–781.
163. Brucoleri R.E., Haber E., Novotny J. // Nature. 1988. Vol. 335. P. 564–569.
164. Meirovitch H., Vasquez M., Scheraga H.A. // J. Chem. Phys. 1990. Vol. 80. P. 1248–1255.
165. O'Toole E.M., Panagiotopoulos A.Z. // Ibid. 1992. Vol. 85. P. 8944–8950.

- 166 O'Toole E M Panagiotopoulos A Z // *Ibid* 1993 Vol 86 P 3185-3191
- 167 Premilat S // *Ibid* 1988 Vol 77 P 3385-3389
- 168 Garel T Niel J C Orland H Velikson B // *Ibid* 1991 Vol 83 P 2473-2478
- 169 Garel T Niel J C Orland H et al // *Ibid* P 2479-2484
- 170 Bascle J Garel T Orland H Velikson B // *Biopolymers* 1993 Vol 33 P 1843-1849
- 171 Li Z Scheraga H A // *Proc Nat Acad Sci US* 1987 Vol 84 P 6611-6615
- 172 Li Z Scheraga H A // *J Mol Struct* 1988 Vol 179 P 333-350
- 173 Metropolis N Rosenbluth A W Rosenbluth M N et al // *J Chem Phys* 1953 Vol 21 P 1087-1095
- 174 Saunders M // *J Comput Chem* 1989 Vol 10 P 203-209
- 175 Ferguson D M Raber D J // *J Amer Chem Soc* 1989 Vol 111 P 4371-4378
- 176 Chang G Guda W C Still W C // *Ibid* P 4379-4385
- 177 Saunders M Houk K N Wu Y D et al // *Ibid* 1990 Vol 112 P 1419-1426
- 178 Richards N G J Williams P B // *Chem Des Automat News* 1994 Vol 9 P 1-9
- 179 Ripoll D R Scheraga H A // *Biopolymers* 1988 Vol 27 P 1283-1303
- 180 Ripoll D R Scheraga H A // *Ibid* 1990 Vol 30 P 165-176
- 181 Ripoll D R Vasquez M J Scheraga H A // *Ibid* 1991 Vol 31 P 319-330
- 182 Piel L Scheraga H A // *Ibid* 1987 Vol 26 P S33-S58
- 183 Abagyan R Totrov M // *J Mol Biol* 1994 Vol 235 P 983-1002
- 184 Kirkpatrick S Gelatt C D Jr Vecchi M P // *Science* 1983 Vol 220 P 671-680
- 185 Vanderbilt D Louie S G // *J Comput Phys* 1984 Vol 56 P 259-266
- 186 Cerny V // *J Optimiz Theory Appl* 1985 Vol 45 P 41-45
- 187 Aarts E Korst J *Simulated annealing and Boltzmann machines* Chichester Wiley 1989
- 188 Basu A Frazer L N // *Science* 1990 Vol 249 P 1409-1412
- 189 Berendsen H J C Postma J P M Gunsteren W F et al // *J Chem Phys* 1984 Vol 81 P 3684-3694
- 190 Tobias D J Maryna G J Klein M L // *J Phys Chem* 1993 Vol 97 P 12959-12966
- 191 Weis W I Brunger A T Skehel J J Wiley D C // *J Mol Biol* 1990 Vol 212 P 737-761
- 192 Brunger A T // *Ibid* 1988 Vol 203 P 803-816
- 193 Nilges M Gronenborn A M Brunger A T Clore G M // *Protein Eng* 1988 Vol 2 P 27-35
- 194 Nilges M Clore G M Gronenborn A M // *FEBS Lett* 1988 Vol 239 P 129-134
- 195 Snow M E // *J Comput Chem* 1992 Vol 13 P 575-582
- 196 Snow M E // *Proteins Struct Funct Genet* 1993 Vol 15 P 183-190
- 197 Wilson S R Cui W Moskowitz J W Schmidt K E // *Tetrahedron Lett* 1988 Vol 29 P 4373-4377
- 198 Kawai H Kikuchi T Okamoto Y // *Protein Eng* 1989 Vol 3 P 85-92
- 199 Wilson S R Cui W // *Biopolymers* 1990 Vol 29 P 225-235
- 200 Nayeem A Vila J Scheraga H A // *J Comput Chem* 1991 Vol 12 P 594-601
- 201 Morales L B Garduno Juarez R Romero D // *J Biomol Struct Dyn* 1991 Vol 8 P 721-730
- 202 Morales L B Garduno Juarez R Romero D // *Ibid* 1992 Vol 9 P 951-956
- 203 Berg B A Neuhaus T // *Phys Lett* 1991 Vol 267 P 249-252
- 204 Hansmann U H E Okamoto Y // *J Comput Chem* 1993 Vol 14 P 1333-1339
- 205 Freyberg B Braun W // *Ibid* 1991 Vol 12 P 1065-1071
- 206 Shin J K Jhon M S // *Biopolymers* 1991 Vol 31 P 177-189
- 207 Higo J Collura V Garnier J // *Ibid* 1992 Vol 32 P 33-42
- 208 Noguti T Go N // *Ibid* 1985 Vol 24 P 527-546
- 209 Collura V Higo J Garnier J // *Protein Sci* 1993 Vol 2 P 1502-1509
- 210 Lambert M H Scheraga H A // *J Comput Chem* 1989 Vol 10 P 770-797
- 211 Lambert M H Scheraga H A // *Ibid* P 798-816
- 212 Lambert M H Scheraga H A // *Ibid* P 817-834
- 213 Cohen F E Abarbanel R M Kuntz I D Fletterick R J // *Biochemistry* 1986 Vol 25 P 266-271
- 214 Curtis B M Presnell S R Srinivasan S et al // *Proteins Struct Funct Genet* 1991 Vol 11 P 111-122
- 215 Ring C S Cohen F E // *FASEB J* 1993 Vol 7 P 783-790
- 216 Rackovsky S // *Proc Nat Acad Sci US* 1993 Vol 90 P 644-649
- 217 Pitsyn O B Rashin A A // *Biophys Chem* 1975 Vol 3 P 1-7

- 218 Cohen F E Richmond T J Richards F M // J Mol Biol 1979 Vol 132 P 275-288
- 219 Cohen F E Sternberg M J E Taylor W R // Nature 1980 Vol 285 P 378-382
- 220 Cohen F E Kosen P A Kuntz I D et al // Science 1986 Vol 234 P 349-356
- 221 Cohen F E Kuntz I D // Proteins Struct Funct Genet 1987 Vol 2 P 162-170
- 222 Powers R Garrett D S March C J et al // Science 1992 Vol 256 P 1673-1681
- 223 Smith L J Redfield C Boyd J et al // J Mol Biol 1992 Vol 224 P 899-904
- 224 Walter M R Cook W J Zhao B G et al // J Biol Chem 1992 Vol 267 P 20371-20380
- 225 Wlodaver A Pavlovsky A Gustchina A // FEBS Lett 1992 Vol 309 P 59-64
- 226 Crippen G M // J Comput Chem 1982 Vol 3 P 471-476
- 227 Crippen G M // Ibid 1989 Vol 10 P 896-901
- 228 Snow M E Crippen G M // Intern J Peptide and Protein Res 1991 Vol 38 P 161-170
- 229 Purisima E O Scheraga H A // J Mol Biol 1987 Vol 196 P 697-709
- 230 Schaik R C Berendsen H J C Torda A E Gunsteren W F // Ibid 1993 Vol 234 P 751-763
- 231 Lautz J Kessler H Blaney J M et al // J Peptide and Protein Res 1989 Vol 33 P 281-292
- 232 Havel T F // Progr Biophys and Mol Biol 1991 Vol 56 P 43-65
- 233 Piela L Kostrowicki J Scheraga H A // J Phys Chem 1989 Vol 93 P 3339-3350
- 234 Kostrowicki J Piela L Cherayil B J Scheraga H A // Ibid 1991 Vol 95 P 4113-4130
- 235 Kostrowicki J Scheraga H A // Ibid 1992 Vol 96 P 7442-7451
- 236 Goldberg D E Genetic algorithms in search optimization and machine learning Reading (MA ss) Addison Wesley 1989
- 237 Dandekar T Argos P // Protein Eng 1992 Vol 5 P 637-645
- 238 Unger R Moulton J // J Mol Biol 1993 Vol 231 P 75-87
- 239 Sun S // Protein Sci 1993 Vol 2 P 762-770
- 240 Judson R S Colvin M E Meza J C et al // Intern J Quant Chem 1992 Vol 44 P 277-284
- 241 Judson R S // J Phys Chem 1992 Vol 96 P 10102-10109
- 242 Sun S Luo N Ornstein R L Rein R // Biophys J 1992 Vol 62 P 104-110
- 243 Tuffery P Etchebest C Hazout S Lavery R // J Biomol Struct Dyn 1991 Vol 8 P 1267-1274
- 244 McGarrah D Judson R S // J Comput Chem 1993 Vol 14 P 1385-1392
- 245 Le Grand S M Merz K M // J Global Optimization 1993 Vol 3 P 49-55
- 246 Forrest S // Science 1993 Vol 261 P 872-890
- 247 Понев Е М // Природа 1994 № 6 С 59-67

Часть III

ОЛИГОПЕПТИДЫ

Разработка термодинамической бифуркационной теории свертывания белковой цепи, физической теории структурной организации природной аминокислотной последовательности, метода теоретического конформационного анализа, а также результаты расчета конформационных возможностей простейших производных двадцати стандартных α -аминокислот и большого числа молекул с двумя и тремя аминокислотными остатками в цепи, представленные в первых двух частях книги, позволили перейти к изучению пространственного строения более сложных природных пептидных объектов. Главная цель исследования заключалась в количественной оценке вкладов средних межстаточных взаимодействий в конформационную энергию олигопептидов постепенно увеличивающейся длины и выяснении роли этих взаимодействий в структурировании фрагментов белковой цепи.

Глава 8

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА БРАДИКИНИНПОТЕНЦИРУЮЩИХ ПЕПТИДОВ

Первыми природными объектами рассмотрения будут брадикининпотенцирующие пептиды (БПП). Речь пока пойдет только об их конформационных возможностях; вопросы связи между структурой и биологическими свойствами, т.е. структурно-функциональной организации олигопептидов, обсуждаются в следующем томе. Отметим лишь, что молекулы БПП усиливают и пролонгируют депрессорный эффект брадикинина на кровяное давление, ингибируют ферменты, расщепляющие кинин, а также являются эффективными ингибиторами пептидил-дипептидазы – фермента, катализирующего превращение ангиотензина I в повышающий кровяное давление ангиотензин II. Самыми эффективными представителями этой группы являются природные пента-, нона- и декабрадикининпотенцирующие пептиды, структурная организация которых вместе с некоторыми их синтетическими аналогами рассматривается ниже [1, 2].

Брадикининпотенцирующий пентапептид. Брадикининпотенцирующий пентапептид $\langle \text{Glu}^1\text{--Lys}^2\text{--Trp}^3\text{--Ala}^4\text{--Pro}^5 \rangle$ (БПП₅) – самый активный природ-

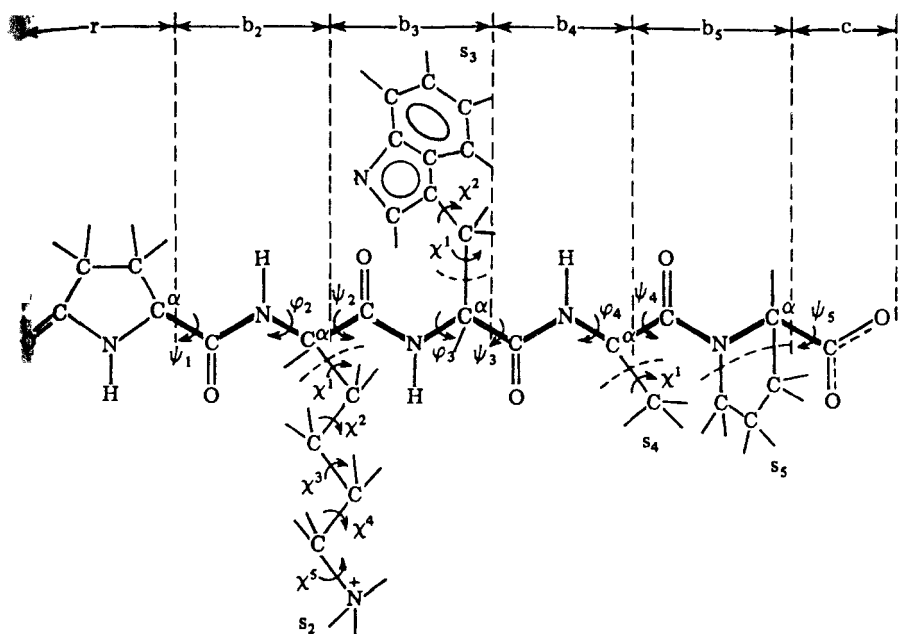


Рис. III.1. Расчетная модель молекулы брадикининпотенцирующего пентапептида (БПП₅)

ный ингибитор ангиотензиобрабатывающего фермента. Расчетная модель молекулы с обозначением всех переменных параметров приведена на рис. III.1. Конформационный анализ БПП₅ [3] включал независимое рассмотрение двух свободных трипептидных фрагментов: $\langle \text{Glu}^1\text{--Lys}^2\text{--Trp}^3\text{--NHC}^\alpha \text{ (I)}$ и $\text{C}^\alpha\text{CO--Trp}^3\text{--Ala}^4\text{--Pro}^5 \text{ (II)}$. Начальные приближения фрагмента (II) формировались исходя из 18 ротамеров остатка Trp^3 (с R-, B-, L-формами основной цепи с углами $\chi_1 = 60, 180, -60^\circ$ и $\chi_2 = 90$ и -90° боковой цепи), 84 оптимальных конформаций метиламида N-ацетил-L-лизина, попадающих в интервал 0–3,5 ккал/моль, и двух ротамеров $\langle \text{Glu}^1(\text{R}, \text{B})$. Конформации (I) с R-формой остатка пироглутаминовой кислоты ($\langle \text{Glu}^1$) во всех случаях оказались более предпочтительными соответствующим конформациям с B-формой остатка. Поэтому приводимые данные касаются вариантов только с R-формой $\langle \text{Glu}^1$. Конформации фрагмента (I), отобранные для расчета пентапептида, попадают в интервал энергии от 0 до 5 ккал/моль. Выбор сравнительно большой величины критической энергии, устанавливающей границу между конформациями, используемыми в последующем анализе структуры БПП₅, и конформациями, исключаемыми из рассмотрения, обусловлен природой аминокислотных остатков фрагмента (I). Дело в том, что входящие в него остатки обладают большой потенциальной к разного рода стабилизирующим взаимодействиям, которые в самом благоприятном случае не могут быть реализованы более чем наполовину в пределах трипептида (I).

Энергетическое распределение оптимальных конформаций молекулы БПП₅

$U_{\text{общ}}$ ккал/моль	Шейп основной цепи																							
	eeee				feee				eeef				fefe				ffee				ffff			
	Форма основной цепи																							
	R ¹ L ² B ³ B ⁴ R ⁵	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R							
0-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-							
1-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	2	-							
2-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	11	-	-	-	-	8	-							
3-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	6	-	-	-	-	8	-							
4-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	10	-	-	-	-	11	-							
5-6	-	-	10	-	1	-	-	-	-	6	5	-	-	-	-	16	-							
6-8	-	-	20	-	4	-	-	-	-	6	10	3	3	-	-	18	9							
> 8	12	8	53	36	11	12	12	5	20	12	45	44	5	5	7	39								

Нулевые приближения второго трипептидного фрагмента БПП₅, C^αCO-Trp³-Ala⁴-Pro⁵ (II) формировались на основе R-, B- и L-форм основных цепей остатков Trp³ и Ala⁴, шести состояний боковой цепи Trp³ ($\chi_1 = 60, 180$ и -60° , $\chi_2 = 90$ и -90°) и R(B)-формы Pro⁵ (R- и B-формы C-концевого остатка практически тождественны). Энергия $U_{\text{общ}}$ всех конформаций, полученных после минимизации при вариации указанных на рис. III.1 углов ϕ, ψ, χ , обнаруживает очень большой разброс значений. Дальнейшего рассмотрения заслуживают конформации с формами основной цепи B-B-R, R-L-R, L-B-R (*ee*) и R-B-R, B-L-R (*fe*). Высокая энергия всех конформаций других форм обусловлена главным образом наталкиванием боковых цепей Ala⁴ и Pro⁵.

Результаты конформационного анализа фрагментов <Glu¹-Lys²-Trp³-NHSC^α и C^αCO-Trp³-Ala⁴-Pro⁵ позволяют прежде всего сделать вывод о нереальности всех структурных вариантов с формой R-L-L у (I) и формами B-R-R, R-R-R и L-R-R у (II). Следовательно, последующее рассмотрение сводится к анализу конформаций 8 шейпов из 16 возможных в общем случае для пентапептида. Они представляют собой комбинации шейпов *ef, fe* и *ff* фрагмента (I) и *ee, fe* (II). Каждый шейп БПП₅ включает формы основной цепи низкоэнергетических конформаций фрагментов. Представление о распределении 530 оптимальных конформаций молекулы БПП₅ дает табл. III.1. Переход от свободных фрагментов (I) и (II) к пентапептиду сопровождается резкой дифференциацией конформаций по энергии. Из многочисленного набора возможных конформаций БПП₅, составленных из предпочтительных состояний трипептидов (I) и (II), выде-

ляется небольшое количество реальных низкоэнергетических структур. В интервал 0–5,0 ккал/моль попадают конформации только трех форм основной цепи, принадлежащих шейпам *fefe* и *fffe*. Энергия конформаций других шейпов близка сумме величин соответствующих состояний свободных фрагментов.

Предпочтительные конформации БПП₅ имеют шейки основной цепи *fffe* и *fefe*. Их преимущество перед другими рассчитанными конформациями молекулы не может быть объяснено только тем, что они представляют собой сочетания выгодных конформационных состояний перекрывающихся фрагментов (I) и (II) и не отличаются от большинства вариантов других шейпов. Расчет показал, что низкая энергия некоторых конформаций *fffe* и *fefe* связана главным образом с реализацией возможности, предоставляемой только этими шейпами, образовывать эффективные стабилизирующие взаимодействия между удаленными в последовательности остатками. При шейпе *fefe* возможны дополнительные взаимодействия на тетрапептидном участке между остатками Lys² и С-концевым фрагментом молекулы. Действительно, они возникают в большом числе конформаций формы R–B–B–L–R при состояниях боковой цепи лизина s₂, со значениями углов $\chi_1, \chi_2 \sim 60, 180^\circ$ (12), 180, 60° (21) и 180, 180° (22); более выгодно положение 12. В глобальной конформации R¹–B²₁₂₂₁–B³₂₁–L⁴–R⁵ гидрофобная часть боковой цепи Lys² взаимодействует с пептидной группой b₅ (–4,3 ккал/моль), а ее положительно заряженная группа +N⁵H₃ – с отрицательно заряженной карбоксильной группой Pro⁵ (–6,7 ккал/моль). Столь сильные дополнительные взаимодействия на тетрапептидном участке не нарушают, однако, стабилизирующих контактов s₂ с элементом основной цепи b₄ (–3,4 ккал/моль), характерных для свободного фрагмента (I); сохраняются также другие благоприятные взаимодействия на моно-, ди- и трипептидных участках. Общий эффект взаимодействий боковой цепи Lys² в глобальной конформации R¹–B²₁₂₂₁–B³₂₁–L⁴–R⁵ составляет около –15 ккал/моль. Энергия U_{общ} других предпочтительных конформаций с формой основной цепи R–B–B–L–R определяется в основном величиной стабилизирующего вклада Lys². При значении угла $\chi_1 \sim -60^\circ$ цепь s₂ ориентирована в противоположную от Pro⁵ сторону и существенных стабилизирующих контактов не образует. Лучшая конформация этой формы с $\chi_1 \sim -60^\circ$ (R¹–B²₃₂₃₂–B³₃₂–L⁴–R⁵) проигрывает глобальной 7,4 ккал/моль.

Низкоэнергетическая конформация с формой R–B–R–B–R шейпа *fefe* (U_{общ} = –2,2 ккал/моль) имеет практически те же дополнительные взаимодействия Lys² на тетрапептидном участке. Однако они могут реализовываться только при одном положении боковой цепи лизина: $\chi_1, \chi_3 \sim 180^\circ, \chi_2, \chi_4 \sim 60^\circ$ (2121) (при форме R¹–B²–B³–L⁴–R⁵ этого же шейпа таких положений, по крайней мере, семь). Форма R–B–R–B–R, кроме того, не обеспечивает одновременно с взаимодействиями b₅–s₂ и с–s₂ взаимодействия s₂ с b₄, которое у R¹–B²₂₁₂₁–R³₁₁–B⁴–R⁵ составляет всего –0,6 ккал/моль (в конформации R¹–B²₁₂₂₁–B³₂₁–L⁴–R⁵ вклад U_{b4–s2} равен

3,5 ккал/моль). Следовательно, можно заключить, что форма $R^1-B^2-R^3-B^4-R^5$ значительно менее предпочтительнее формы $R^1-B^2-B^3-L^4-R^5$ по энтальпии и энтропии. Поэтому она менее перспективна для молекулы БПП₅. В конформациях шейпа *ffff* вследствие сближенности N- и C-концов основной цепи могут осуществляться взаимодействия на тетра- и пентапептидном участках. Тем не менее, в самой низкоэнергетической конформации *ffff* ($R^1-R_{3223}^2-R_{11}^3-B^4-R^5$, $U_{\text{общ}} = 2,0$ ккал/моль) эти взаимодействия на 5 ккал/моль менее эффективны, чем дополнительные взаимодействия в $R^1-B_{1221}^2-B_{21}^3-L^4-R^5$ ($U_{\text{общ}} = 0$ ккал/моль), что связано с большей удаленностью боковой цепи Lys² от C-концевого участка молекулы. Потеря ~ 8 ккал/моль за счет ослабления контактов b₅-s₂ и с-s₂ лишь частично компенсируется дальними взаимодействиями с-г (-1 ккал/моль), г-b₅ (-1,5 ккал/моль) и b₂-s₂ (-0,8 ккал/моль). Для конформаций с формой R-R-R-B-R характерна более жесткая ориентация боковой цепи Trp³. В низкоэнергетических конформациях она принимает только положение χ_1 , $\chi_2 \sim 60, 90^\circ$ (11), образуя стабилизирующие взаимодействия с элементами г, s₂, s₄ (в сумме около - 4 ккал/моль). Конформации этой формы с боковой цепью Trp³ в положении $\chi_1 \sim 180^\circ$ и $\chi_2 \sim 90, -90^\circ$ (21, 22) проигрывают глобальной структуре более 7 ккал/моль. Меньшей конформационной свободой при форме $R^1-R^2-R^3-B^4-R^5$ обладает и боковая цепь Lys². Практически во всех низкоэнергетических вариантах она ориентирована в сторону N-конца ($\chi_1 \sim -60^\circ$). Таким образом, конформации типа $R^1-R^2-R^3-B^4-R^5$ (*ffff*) уступают по энтальпии и энтропии конформациям $R^1-B^2-B^3-L^4-R^5$ (*feff*). Несмотря на это обстоятельство, нельзя исключить возможность их реализации в сильнополярных средах или при специфическом взаимодействии ионной пары $^+N^5H_3$ COO⁻ молекулы БПП₅ с рецептором, т.е. при значительном ослаблении взаимодействия e-s₂.

Чтобы лучше оттенить особенности структурной организации природного пентапептида БПП₅, рассмотрим пространственное строение одного его синтетического аналога - $\langle \text{Glu}^1\text{-Lys}^2\text{-Phe}^3\text{-Pro}^4\text{-Pro}^5 \rangle$ ([Pro⁴]-БПП₅). Молекулы БПП₅ и [Pro⁴]-БПП₅ различаются природой аминокислотных остатков в третьем и четвертом положениях. Одиночная замена в молекуле БПП₅ остатка Trp³ на аналогичный по конформационным свойствам Phe³ не приводит к изменению активности пентапептида как в отношении ингибирования фермента карбоксикацепсина, катализирующего превращение ангиотензина I в ангиотензин II, так и в отношении расщепления брадикинина. Что касается негомологичной замены Ala⁴ на Pro⁴, то она приводит практически к полной утрате пептидом своей ингибирующей активности и потенцирующего действия. Между тем такая замена не затрагивает ни одну функциональную группу, и поэтому потеря пентапептидом биологических свойств целиком является следствием изменения конформационных возможностей молекулы.

После соответствующего фрагментарного анализа решение было сведено к рассмотрению конформаций четырех форм основной цепи пентапептида, принадлежащих шейпам *feff* (R-B-B-B-R и R-R-L-B-R), *fffe* (R-R-B-B-R), *feff* (R-R-B-B-R) и *eeee* (R-L-B-B-R) [3]. Распреде-

Энергетическое распределение оптимальных конформаций
молекулы [Pro⁴]-БПП₅

$U_{\text{общ}}$, ккал/моль	Шейп основной цепи			
	<i>feee</i>	<i>ffee</i>	<i>feee</i>	<i>eeee</i>
	Форма			
	R-B-B-B-R	R-R-B-B-R	R-R-L-B-R	R-L-B-B-R
0-1	1	—	—	—
1-2	—	—	—	—
2-3	10	—	2	—
3-4	4	2	8	—
4-5	16	21	3	—
5-6	17	29	3	—
6-8	34	23	3	8
> 8	—	10	—	—

ление оптимальных конформаций [Pro⁴]-БПП₅ по величинам относительной энергии приведено в табл. III.2. Самыми низкоэнергетическими и наиболее представительными являются конформации с формой R-B-B-B-R шейпа *feee*. В интервал 0-4,0 ккал/моль попадают 15 конформаций этого типа, 10 - *feee* и 3 - *ffee*. В глобальной структуре [Pro⁴]-БПП₅ R¹-B²₂₂₂₃-B³₁₁-B⁴-R⁵ ($U_{\text{общ}} = 0$) состояния перекрывающихся трипептидных фрагментов не отвечают их минимальной энергии (у R¹-B²₂₂₂₃-B³₁₁ $U_{\text{общ}} = 1,8$, а у B³₁₁-B⁴-R⁵ $U_{\text{общ}} = 0,6$ ккал/моль). Однако сочетание именно этих конформационных состояний приводит к возникновению ряда новых эффективных взаимодействий, в частности между ε-аминогруппой лизина и С-концевой карбоксильной группой пролина (-3,0 ккал/моль), между гидрофобной частью боковой цепи Lys² и бензольным кольцом Phe³. Дополнительный суммарный стабилизирующий эффект в глобальной структуре [Pro⁴]-БПП₅ по сравнению с энергией соответствующих состояний двух трипептидов равен -5,0 ккал/моль. Общее заключение, следующее из сопоставления результатов расчета молекул БПП₅ и [Pro⁴]-БПП₅, состоит в констатации существенного различия между их структурами и конформационными возможностями. Конформации, являющиеся самыми предпочтительными для одной молекулы, относятся к наиболее высокоэнергетичным для другой. Форма глобальной конформации природного пептида R-B-B-L-R вообще неприемлема для [Pro⁴]-аналога. Две другие формы предпочтительных вариантов БПП₅ R-R-R-B-R ($U_{\text{общ}} = 2,0$ ккал/моль) и R-B-R-B-R ($U_{\text{общ}} = 2,2$ ккал/моль) также приводят у [Pro⁴]-БПП₅ к высокоэнергетическим конформациям из-за стерических осложнений, возникающих при R-состоянии остатка, предшествующего пролину.

Различие в пространственной организации молекул БПП₅ и [Pro⁴]-БПП₅ касается не только геометрии предпочтительных конформаций. Оно проявляется в динамических конформационных свойствах двух пентапептидов, в частности в характере влияния внешних условий на положение конформационного равновесия. У БПП₅ оно определяется главным образом двумя состояниями R-B-B-L-R (*fe**fe*) и R-R-R-B-R (*ff**fe*), альтернирующими при изменении окружения, поскольку их относительная стабильность зависит от взаимодействий разной природы (электростатической в первом случае и дисперсионной во втором). У синтетического аналога [Pro⁴]-БПП₅ положение конформационного равновесия не столь чувствительно к внешним условиям; конформационная энергия здесь определяется дисперсионной составляющей, и изменение среды будет приблизительно одинаковым образом сказываться на стабильности всех конформаций. Таким образом, важная особенность пространственной организации природного пентапептида, по-видимому, заключается в достаточно строгой при определенном окружении детерминации основной цепи и в то же время в возможности целенаправленного перехода к другой форме при изменении среды. В водной и гидрофобной средах конформации формы R¹-B²-B³-L⁴-R⁵ пентапептида БПП₅ будут обладать доминирующей энталпийной и энтропийной предпочтительностью по сравнению с конформациями альтернативной формы. В растворах с большой ионной силой, в которых усиливаются дисперсионные и ослабляются электростатические внутримолекулярные взаимодействия, образуются ионные пары с анионами и катионами или с полярными группами других молекул; бесспорное преимущество при этом получают структурные варианты формы R-R-R-B-R.

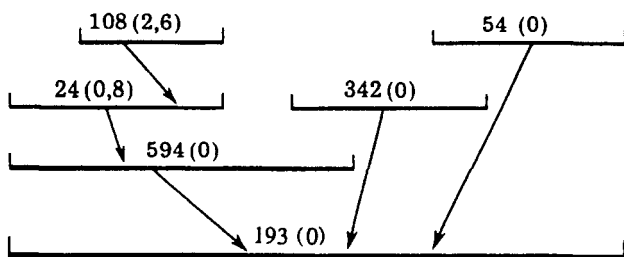
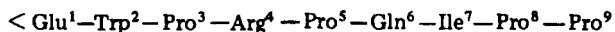
Быть может, именно высокая чувствительность пространственного строения к внешним условиям при строгой его детерминации (альтернируют структуры только определенных типов) обуславливает полифункциональность БПП₅ с сохранением в каждом случае высокой специфичности. Конформации одной формы, например, обеспечивают эффективное ингибирование ангиотензинпревращающего фермента, а другой — способствуют усилению и пролонгированию гипотензивного эффекта брадикинина. Конечно, пока это всего лишь предположение.

Сравнение конформационных возможностей БПП₅ с его аналогами выявило еще одну особенность пространственного строения природной молекулы. Глобальная конформация БПП₅ R¹-B²₁₂₂₁-B³₂₁-L⁴-R⁵ (*fe**fe*) имеет более плотно упакованную свернутую форму основной цепи по сравнению с лучшими вариантами синтетического аналога. Так, энергия межматочных взаимодействий у БПП₅ составляет ~ 18,0 ккал/моль, а у [Pro⁴]-БПП₅ ~ -13,0 ккал/моль. Являясь более компактной по форме и более насыщенной стабилизирующими внутримолекулярными контактами, глобальная структура природного соединения в то же время обладает большими конформационными возможностями в отношении боковых цепей. У молекулы БПП₅ в интервал 0-3,0 ккал/моль попадает 19 структурных вариантов формы R-B-B-L-R с семью различными конформационными состояниями боковой цепи Lys² и пятью Trp³. У молекулы [Pro⁴]-БПП₅ в этом же интервале находятся восемь вариантов формы

R-B-B-R соответственно с тремя и четырьмя состояниями Lys² и Phe³. Для БПП₅ характерно равномерное энергетическое распределение конформаций (0; 0,5; 0,6; 1,2; ... 3,0 ккал/моль). У [Pro⁴]-БПП₅ наблюдается заметный разрыв в величинах энергии глобальной и следующих за ней конформаций (0; 2,4; 2,7; ... 2,9 ккал/моль). Поскольку минимумы потенциальной поверхности природного пентапептида не разделены высокими барьерами, его боковые цепи могут легко совершать взаимообусловленные конформационные перестройки в соответствии с геометрией активного центра рецептора, не повышая заметно при этом своей энергии и не изменяя форму пептидного остова. Отмеченной особенностью обладают также конформации БПП₅ альтернативной формы – R-R-R-B-R (fffe).

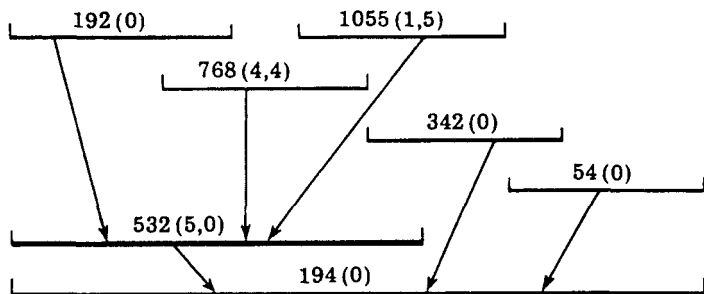
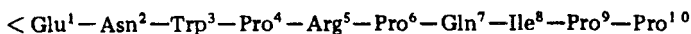
Брадикининпотенцирующий нонапептид. Основные этапы конформационного анализа более сложного природного брадикининпотенцирующего нонапептида (БПП₉) отражены на рис. III.2. На каждой скобе одна из цифр обозначает число рассмотренных конформационных вариантов соответствующего фрагмента, а другая (в скобках) – величину относительной энергии в шкале $U_{\text{общ}}$ данного фрагмента той конформации, которая входит в глобальную структуру всей молекулы. Наиболее низкоэнергетическая конформация БПП₉ представляет собой комбинацию самых низкоэнергетических состояний составляющих ее фрагментов <Glu¹-Pro⁵, Pro⁵-Phe⁷ и Phe⁷-Pro⁹ [4, 5]. В общем случае конформационные состояния нонапептида распадаются на 2⁸=256 шейпов пептидного остова и большое количество форм; при учете конформационной специфики четырех остатков Pro в молекуле число шейпов снижается до 16, а число возможных форм основной цепи – до 100. Предварительный анализ фрагментов привел к необходимости рассмотреть 202 конформации БПП₉, которые относятся всего лишь к трем шейпам, каждый из которых представлен только одной формой основной цепи. Следовательно, изучение конформационных возможностей отдельных участков последовательности БПП₉ выявило значительную дифференциацию их структурных вариантов по форме и шейпу. Резкая энергетическая дифференциация по конформации обнаружилась только на завершающем этапе расчета нонапептида. Как видно из табл. III.3, где приведено распределение конформаций по энергии, наиболее реальными у молекулы БПП₉ являются конформации одной формы; энергия же двух других превышает 8,0 ккал/моль.

В глобальной конформации БПП₉ стержневым элементом, цементирующим эту компактную структуру, является боковая цепь Arg⁴. Ее алифатическая часть осуществляет эффективные стабилизирующие взаимодействия с боковыми и основными цепями остатков Trp³, Pro³, Pro⁸, Pro⁹ и Phe⁷, а полярная гуанидиновая группа образует ионную пару с карбоксильной группой Pro⁹. Общая энергия внутримолекулярных взаимодействий Arg⁴ составляет около –25 ккал/моль. При столь эффективных и многочисленных контактах в глобальной конформации имеет место полная согласованность всех ближних и средних взаимодействий. Ее форма цепи удовлетворяет в максимальной степени взаимодействиям внутри каждого остатка и на каждом отдельном участке и в то же время оказывает-ся предрасположенной к образованию выгодных контактов между всеми



Р и с. III.2. Схема конформационного анализа молекулы брадикининпотенцирующего нонапептида (БПП₉)

Для каждого фрагмента указано число рассчитанных структурных вариантов и относительная энергия конформационного состояния (в скобках, ккал/моль), соответствующего геометрии фрагмента в глобальной структуре молекулы



Р и с. III.3. Схема конформационного анализа молекулы брадикининпотенцирующего декапептида (БПП₁₀)

Для каждого фрагмента указано число рассчитанных структурных вариантов и относительная энергия конформационного состояния (в скобках, ккал/моль), соответствующего геометрии фрагмента в глобальной структуре молекулы

звеньями молекулы. Такой же формой основной цепи обладают еще четыре конформации, энергия которых выше всего на 1–2 ккал/моль. Они отличаются положениями боковых цепей Gln⁶ и Trp⁶ (χ_2).

Брадикининпотенцирующий декапептид. Аминокислотная последовательность другого природного брадикининпотенцирующего декапептида <Glu¹–Asn²–Trp³–Pro⁴–Arg⁵–Pro⁶–Gln⁷–Ile⁸–Pro⁹–Pro¹⁰ (БПП₁₀) отличается от последовательности рассмотренного нонапептида БПП₉ наличием дополнительного остатка Asn², что, однако, почти не отражается на потенцирующей способности этого соединения. Практически одинаковая биологическая активность близких по химическому строению БПП₉ и БПП₁₀ может свидетельствовать о сходстве пространственной организации и динамических конформационных свойств молекул, особенно тех участков, которые в наибольшей степени ответственны за специфическое взаимо-

Энергетическое распределение оптимальных конформаций молекулы БПП₉

Шейп	Форма основной цепи	$U_{\text{общ}}$, ккал/моль			
		>15	15-10	10-8	8-6
<i>feefefee</i>	$R^1-B^2-R^3-B^4-B^5-R^6-B^7-B^8-B^9$	29	3	—	—
<i>feeeffee</i>	$R^1-B^2-B^3-B^4-R^5-R^6-B^7-B^8-B^9$	34	9	15	15
<i>feffefee</i>	$R^1-B^2-R^3-B^4-R^5-R^6-B^7-B^8-B^9$	50	12	10	—

Шейп	Форма основной цепи	$U_{\text{общ}}$, ккал/моль				
		6-4	4-3	3-2	2-1	1-0
<i>feefefee</i>	$R^1-B^2-R^3-B^4-B^5-R^6-B^7-B^8-B^9$	—	—	—	—	—
<i>feeeffee</i>	$R^1-B^2-B^3-B^4-R^5-R^6-B^7-B^8-B^9$	10	1	—	4	—
<i>feffefee</i>	$R^1-B^2-R^3-B^4-R^5-R^6-B^7-B^8-B^9$	—	—	—	—	—

действие с рецептором. Это предположение не было, однако, принято во внимание и рассмотрение структуры БПП₁₀ [6] выполнено без использования данных о пространственной структуре молекулы БПП₉, полученных в работах [4, 5]. При независимом решении конформационных задач для нона- и декапептида сопоставление окончательных результатов может служить эффективной проверкой правильности предсказания пространственного строения обеих молекул, а также способствовать более объективному выявлению связи между их структурой и функцией.

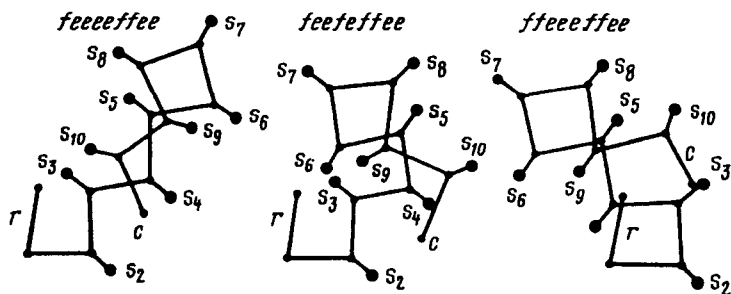
Схема расчета молекулы БПП₁₀ основана на последовательном рассмотрении конформационных возможностей свободных фрагментов, составляющих декапептид (рис. III.3). Разбиение последовательностей нона- и декапептида на отдельные участки существенно различается. Совпадение имеет место лишь в случае двух наиболее простых фрагментов: Pro-Gln-Ile и Ile-Pro-Pro. Исходные приближения для расчета молекулы БПП₁₀ были составлены из низкоэнергетических конформаций шейпов *ffeee*, *ffefe*, *feeee* и *feefe* гексапептида <Glu¹-Pro⁶ и двух трипептидов Pro⁶-Phe⁸ и Ile⁸-Pro¹⁰. При отборе вариантов принят "плавающий" нуль отсчета, что позволило учесть специфику взаимодействий каждого шейпа и возможные перспективные благоприятные контакты при включении фрагмента в структуру всей молекулы декапептида. Кроме того, появилась возможность учесть большинство форм основной цепи с L-состоянием остатков без значительного увеличения числа рассчитываемых вариантов.

Все конформации декапептида (194 варианта) распределяются по 16 шейпам. Минимизация энергии БПП₁₀ была проведена по 28 двугранным углам вращения ϕ , ψ и χ . При этом наблюдалась резкая энергетическая дифференциация конформаций молекулы по форме и шейпу основной цепи. Высокоэнергетичными по разным причинам оказались все конформации 13 из 16 шейпов. Лучшие представители шейпов *feeeeeeee*,

Энергетическое распределение ($U_{\text{общ}}$, ккал/моль) оптимальных конформаций молекулы БПП₁₀

Интервал	Шейп основной цепи		
	<i>feeeeffee</i>	<i>feefeffee</i>	<i>ffeeeffee</i>
0-1	1	—	—
1-2	—	1	—
2-3	—	1	—
3-4	2	—	—
4-5	—	—	2
5-6	—	—	2
6-8	3	4	7
8-10	5	2	7
10-15	7	1	2
>15	11	16	32

ffeeeeeee, *feefeeeee*, *fffeeeeee*, имеющих преимущественно растянутую форму пептидного остова, уступают глобальной конформации БПП₁₀ по энергии более 15,0 ккал/моль. Это обусловлено отсутствием межостаточных взаимодействий более чем трипептидного порядка. Также не эффективны контакты между остатками в конформациях шейпов *ffeeeffee*, *feeeeffee*, *feefeeeffee*, *feeeeffee*, *ffeeeffee*, *ffefeeeffee*, *seefeeeffee*. В некоторых случаях реализация дополнительных взаимодействий сопровождается ухудшением контактов, сложившихся ранее на более коротких участках последовательности. Здесь минимальный проигрыш в энергии составляет 10,0 ккал/моль. Все конформации шейпа *ffefeffee* имеют высокую энергию из-за неустраиваемых при данной форме основной цепи многочисленных наталкиваний противоположных концов молекулы, а также боковых цепей Trp³ и Arg⁵ друг на друга и на остатки Pro⁶, Pro⁹ и Pro¹⁰. Распределение конформаций трех оставшихся шейпов по энергии приведено в табл. III.4, из которой видно, что в каждом шейпе имеется резкая дифференциация конформаций. Из 194 вариантов, составленных из самых предпочтительных состояний фрагментов, в интервал 0-5,0 ккал/моль попадают всего восемь конформаций. В глобальной конформации $R^1-B_{11}^2-B_{32}^3-B^4-B_{3232}^5-R^6-R_{311}^7-B_{33}^8-B^9-B^{10}$ (*feeeeffee*) основная цепь, образуя небольшой изгиб на начальном дипептидном участке, имеет развернутый характер до остатка Pro⁶. Затем на участке Pro⁶-Gln⁷-Ile⁸ она изменяет свое направление на 180° и вновь приобретает развернутый вид. При такой форме основной цепи С-концевой фрагмент Pro⁹-Pro¹⁰ оказывается сближенным с центральным участком молекулы Pro⁴-Arg⁵ (рис. III.4). Энергия взаимодействия между ними составляет -14,6 ккал/моль. Матрица межостаточных контактов делится на две субматрицы, отражающие локализацию взаимодействий внутри фрагментов <Glu¹-Asn²-Trp³-Pro⁴-Arg⁵-NHCO^α и C^αCO-Arg⁵-Pro⁶-Gln⁷-Ile⁸-Pro⁹-Pro¹⁰. Контакты, объединяющие обе части молекулы в единую структуру, осуществляются остатком Arg⁵ и отчасти Pro⁴



Р и с. III.4. Шейпы пептидного скелета предпочтительных конформаций молекулы брадикининпотенцирующего декапептида (БПП₁₀)

Боковая цепь Arg⁵ в глобальной конформации оказывается одновременно сближенной с обоими концами пептидной цепи. Она образует своей гуанидиновой группой эффективную ионную пару с группой COO⁻ остатка Pro¹⁰ (-5,1 ккал/моль). Энергия стабилизирующих взаимодействий гидрофобной части боковой цепи Arg⁵ с предшествующими остатками равна -2,4 ккал/моль, а с последующими - -8,4 ккал/моль. Элементом, стабилизирующим фрагмент <Glu¹-Asn²-Trp³-Pro⁴-Arg⁵-NHCO, является Trp³, который осуществляет контакты со всеми остатками, входящими во фрагмент (-5,1 ккал/моль). На втором участке C^αCO-Arg⁵-Pro⁶-Gln⁷-Ile⁸-Pro⁹-Pro¹⁰-COO⁻ такую роль выполняет остаток Pro⁹, стабилизирующий эффект которого весьма значителен (-10,2 ккал/моль). Малоэффективны взаимодействия остатков Gln⁷ и Ile⁸, их боковые цепи обращены в сторону растворителя. Фрагменты, как видно из рис. III.3, входят в глобальную конформацию в оптимальных формах, попадающих в интервал 0-5,0 ккал/моль, сохраняя основные присущие им стабилизирующие взаимодействия. Это, как и у БПП₉, подтверждает принцип согласованности ближних и средних взаимодействий в пептидной цепи. Шейпы глобальной и следующих за ней по величине $U_{\text{общ}}$ двух других конформаций (1,8 и 4,4 ккал/моль) (см. табл. III.4) имеют между собой много общего. Различия предпочтительных структур разных типов касаются только двух остатков; у конформации с $U_{\text{общ}} = 1,8$ ккал/моль остаток Pro⁴, а у конформации с $U_{\text{общ}} = 4,4$ ккал/моль остаток Asn² имеют не В-форму, как у глобального варианта, а R. Три низкоэнергетические конформации БПП₁₀, по существу, демонстрируют разные способы плотной упаковки одних и тех же элементов пространственной структуры молекулы.

Сравним результаты теоретического конформационного анализа нона- и декабрадикининпотенцирующих пептидов. Независимое рассмотрение молекул БПП₉ и БПП₁₀ приводит к заключению о близости их предпочтительных структур (табл. III.5). В обоих случаях имеет место совпадение не только шейпов, но и форм основных цепей, а во многих случаях ориентаций боковых цепей на октапептидных участках (соответственно Trp²-Pro⁹ и Trp³-Pro¹⁰). Положение боковой цепи Trp² при $\chi_1 \sim 60^\circ$ и $\chi_2 \sim -90^\circ$ у глобальной конформации нонапептида является наилучшим в отношении взаимодействий с боковой цепью Arg⁴. Однако у декапептида

Таблица III.5

**Предпочтительные конформации брадикининпотенцирующих
декапептида и нонапептида**

Шейп	<Glu ¹ -	Asn ² -	Trp ³ -	Pro ⁴ -	Arg ⁵ -	Pro ⁶ -	Gln ⁷ -	Ile ⁸ -	Pro ⁹ -	Pro ¹⁰	Уобщ, ккал/моль
<i>feeeffee</i>	R ¹ -	B ² ₁₁ -	B ³ ₃₂ -	B ⁴ -	B ⁵ ₃₂₃₂ -	R ⁶ -	R ⁷ ₃₁₁ -	B ⁸ ₃₃ -	B ⁹ -	B ¹⁰	0
<i>f-eeeffee</i>	R ¹ -	-	B ³ ₁₂ -	B ⁴ -	B ⁵ ₃₂₃₂ -	R ⁶ -	R ⁷ ₃₁₁ -	B ⁸ ₃₃ -	B ⁹ -	B ¹⁰	0
<i>feefeffee</i>	R ¹ -	B ² ₁₁ -	B ³ ₃₂ -	R ⁴ -	B ⁵ ₃₂₃₂ -	R ⁶ -	R ⁷ ₃₁₁ -	B ⁸ ₃₃ -	B ⁹ -	B ¹⁰	1,8
<i>f-efeffee</i>	R ¹ -	-	B ³ ₃₁ -	R ⁴ -	B ⁵ ₁₃₂₂ -	R ⁶ -	R ⁷ ₃₁₁ -	B ⁸ ₃₃ -	B ⁹ -	B ¹⁰	8,1

из-за удлинения цепи с N-конца изменяется состояние остатка Trp³ ($\chi_1 \sim -60^\circ$, $\chi_2 \sim -90^\circ$), что позволяет ему сохранить большую часть благоприятных контактов, существующих у БПП₉. У второй пары сопоставляемых конформаций структура БПП₁₀ с энергией 1,8 ккал/моль имеет более эффективные взаимодействия Trp³ с <Glu¹ и с Asp², чем структура БПП₉ с энергией 8,1 ккал/моль. Молекулы нона- и декапептида с (B-R-B)-формой основной цепи участков Trp³-Pro⁴-Arg⁵ (нумерация соответствует БПП₁₀) лишены возможности образовывать близкие контакты между остатками Trp³ и Arg⁵ при всех допустимых ориентациях боковых цепей. Из-за разного характера взаимодействий остатков на N-концевых участках молекул наблюдается большое различие в энергии у двух ближайших конформаций БПП₉ (8,1 ккал/моль) и малое различие у БПП₁₀ (1,8 ккал/моль).

Г л а в а 9

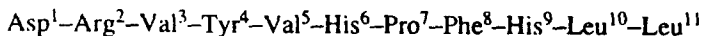
КОНФОРМАЦИОННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ МОЛЕКУЛЫ АНГИОТЕНЗИНА II

Ангиотензин II – октапептидный тканевый гормон, входит в качестве центрального действующего элемента в ферментную ренин-ангиотензиновую систему, в которой осуществляется его биогенез и распад. Ангиотензин II – самый мощный из известных прессорных агентов в системе кровообращения. Он стимулирует сужение периферических артериол по всему организму и тем самым повышение артериального давления. Помимо этого ангиотензин II активизирует секрецию ряда гормонов (главным образом альдостерона), влияет на работу сердца, печени, центрального и периферического отделов нервной системы, а также вызывает ряд других откликов в организме млекопитающих. Его биохимический предшественник – ангиотензин I, образуется, согласно приведенной ниже схеме, из глобулярного белка крови ангиотензиногена при действии протеолитического фермента ренина.

Почти все ткани обладают пептидазной активностью, быстро разрушающей ангиотензин II. Один из путей деградации ангиотензиногена II представлен на схеме. Из плазмы крови млекопитающих выделены две разновидности гормона. Одна из них приведена на схеме. Другая отличается от нее остатком Ile в положении 5.

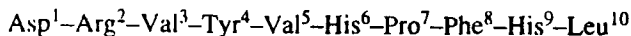
Химический синтез ангиотензина II в 1961 г. [7] положил начало изучению его биологических свойств. С помощью многочисленных синтетических аналогов гормона удалось выяснить, что природный пептид взаимодействует с рядом рецепторов, расположенных в различных тканях организма млекопитающих, и обладает широким спектром биологического действия. Опубликовано много работ, посвященных исследованию пространственного строения ангиотензина II в растворе. В них использован практически весь арсенал существующих физико-химических методов:

Ангиотензиноген



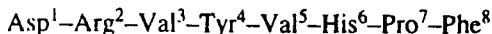
Ренин

Ангиотензин I



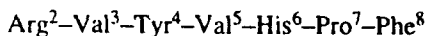
Киназа II

Ангиотензин II



Аминопептидаза

Ангиотензин III



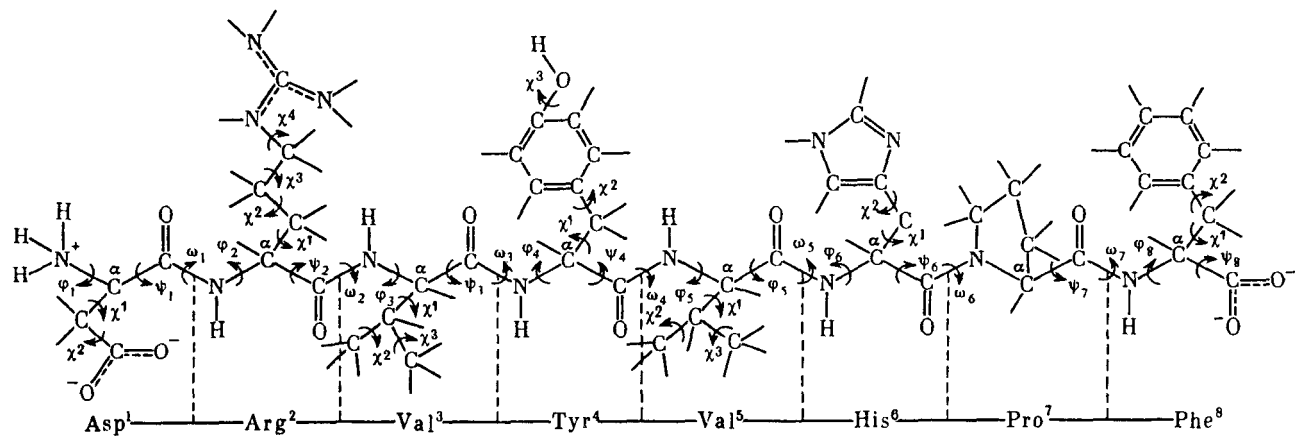
тонкоплочный диализ [8], титрование ионогенных групп [9], водородный обмен [10], все виды оптической и резонансной молекулярной спектроскопии [11–14] и ряд других. Результаты исследований и их интерпретация противоречивы. Разными авторами было предложено большое число существенно отличающихся друг от друга структур ангиотензина II [15–19]. Каждая из них касается исключительно основной цепи молекулы и удовлетворяет лишь ограниченному кругу экспериментальных данных (см. ниже). Положение боковых цепей аминокислотных остатков, составляющих большую часть молекулы (по числу атомов – 2/3) и формирующих ее конформационное состояние, при обсуждении структуры гормона вообще не рассматривается [20–27].

Основная причина малой эффективности физико-химических методов исследования пространственного строения ангиотензина II, как и других олигопептидов, связана с тем, что для изучения структурно-функциональной организации этих соединений недостаточно знания лишь самой выгодной по энергии конформации в случае белков, или представления о среднестатистическом конформационном состоянии молекулы в случае синтетических пептидов [28, 29]. Здесь требуется количественная оценка геометрических параметров ряда структур, их конформационных возможностей и вероятности реализации в различных условиях. Получение такой информации, как правило, находится за пределами чувствительности и интерпретационных возможностей физико-химических методов. Более того, из-за сложности соединений и недостаточной разработанности физических основ соответствующих явлений редко когда хотя бы один из методов позволяет однозначно и достаточно полно описать даже одно доминирующее в растворе конформационное состояние пептида, используя лишь результаты собственных измерений.

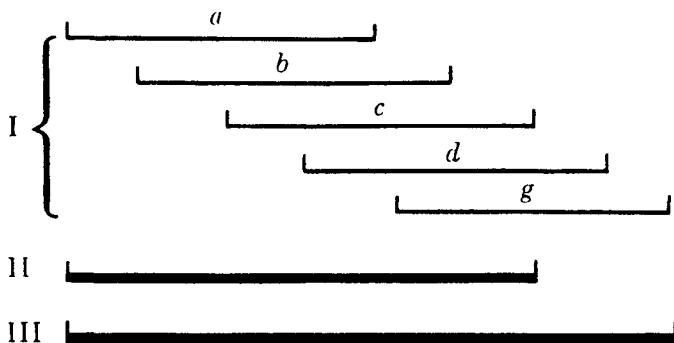
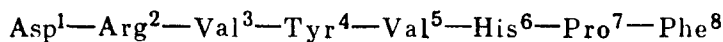
К решению этих задач привлечен полуэмпирический метод конформационного анализа. Однако и здесь полученные результаты весьма скромны. Из сопоставления имеющихся в литературе многочисленных расчетных данных о конформационных возможностях ангиотензина II следует, что предложенные для гормона наборы низкоэнергетических структур существенно отличаются друг от друга. Именно данное обстоятельство побудило предпринять собственное исследование структурной организации молекулы этого соединения. К обсуждению опубликованных работ по теоретическому конформационному анализу октапептидного гормона мы вернемся в заключительной части главы.

Структурная организация молекулы ангиотензина II исследована на основе конформационной теории (см. гл. 2) и соответствующего расчетного метода (см. гл. 7) в предположении жесткой валентной схемы, представленной на рис. III.5. Конформационные возможности октапептидного гормона определяются 41 значением двугранных углов вращения вокруг связей основной цепи (φ , ψ , ω) и боковых цепей (χ_1 , χ_2 , ...). Использованные в расчете потенциальные функции и полуэмпирические параметры для оценки невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий и водородных связей указаны в работах [30, 31]. В расчете и при изложении результатов использована естественная классификация пептидных структур по трем уровням пространственной организации: конформации, форме и шейпу основной цепи (см. гл. 7). Конформационный анализ октапептидного гормона был разбит на три этапа (рис. III.6). Первый включал в себя независимый расчет пяти перекрывающихся по трем аминокислотным остаткам тетрапептидных фрагментов (a–g). Второй этап заключался в расчете гексапептидного фрагмента Asp¹–His⁶, а третий – в расчете всей молекулы ангиотензина II. Подробно результаты расчета рассмотрены в работе Т.В. Гогитидзе и автора данной монографии [32]. Здесь дано описание лишь заключительного этапа.

Низкоэнергетические конформационные состояния N-концевого гексапептидного участка и тетрапептидных фрагментов d и g составили 55 исходных структурных вариантов гормона. После минимизации энергии в интервал 0–8,0 ккал/моль попали 14 конформаций, представленных в табл. III.6. Первые четыре структуры с $U_{\text{общ}} = 0\text{--}4,0$ ккал/моль составляют группу А. Для них характерна жесткая нуклеация типа *fef* центрального участка молекулы при относительной подвижности N- и C-концевых дипептидных фрагментов. На рис. III.7 показаны шейпы пептидных скелетов этих структур и пути их взаимной конверсии. Все изменения конформационных состояний основной цепи ангиотензина в пределах группы А осуществляются через вращения вокруг связи C ^{α} –C' остатка Arg² или Pro⁷, точнее, через низкоэнергетические переходы R $\leftrightarrow$ В путем изменения соответствующего угла ψ на 180°. Следующие шесть конформаций с относительно невысокой энергией ($U_{\text{общ}} = 3,5\text{--}7,0$ ккал/моль), объединенные в группу В, также имеют жесткую структуру центрального участка Val³–His⁶. Она принадлежит шейпу *fee* и отличается от структуры этого участка в предшествующих конформациях состоянием лишь одного остатка (Val⁵). Переход между представителями групп А и В низкоэнергетичен и сводится к изменению двугранного угла ψ_5 (рис. III.8). При этом боковая



Р и с. III.5. Расчетная модель молекулы ангиотензина II



Р и с. III.6. Схема конформационного анализа молекулы ангиотензина II

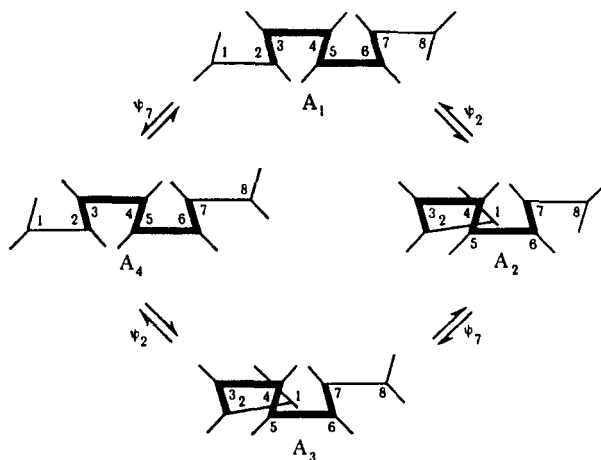
цепь остатка His^6 удаляется от бензольного кольца боковой цепи остатка Tyr^4 , что приводит к небольшой ($\sim 1,0$ ккал/моль) дестабилизации конформаций группы В относительно А. Шейпы шести низкоэнергетических конформаций группы В и пути перехода их друг в друга показаны на рис. III.9. Лучшие конформации групп С, D, E, F заметно уступают по энергии конформациям групп А и В. Они менее компактны и проигрывают прежде всего по энергии невалентных взаимодействий. Следующие представители этих групп имеют энергию, превышающую 10 ккал/моль. Итак, спектр энергетического распределения оптимальных конформаций ангиотензина II состоит из нескольких основных уровней (А, В, С, ...), определяемых конформационными состояниями центрального фрагмента $\text{Val}^3\text{—His}^6$, и небольшого числа подуровней, различающихся конформационными состояниями лабильных N- и C-концевых дипептидов; первый может принимать пространственные формы всех возможных типов (*ee*, *ef*, *fe*, *ff*), а второй – только двух (*ee*, *ef*). Распределение конформаций в каждом семействе по энергии в наибольшей мере зависит от числа и эффективности стабилизирующих контактов между остатками лабильных и жестких фрагментов.

Из сопоставления представленных в табл. III.6 энергетических вкладов от ван-дер-ваальсовых, электростатических и торсионных взаимодействий в низкоэнергетические конформации молекулы ангиотензина следует, что решающее значение в стабилизации пространственной структуры имеют ван-дер-ваальсовы, точнее дисперсионные взаимодействия или, иными словами, плотность упаковки аминокислотной последовательности. Между величинами $U_{\text{общ}}$ и $U_{\text{вдв}}$ четкой корреляции нет, хотя тенденции в их изменении аналогичны. Конформации А в среднем компактнее В ($U_{\text{вдв}}^{\text{А}} = -38,6$, а $U_{\text{вдв}}^{\text{В}} = -36,4$ ккал/моль) и тем более С, D. Более детальное представление о факторах, стабилизирующих конформации семейств А и В, дают треугольные матрицы энергии межостаточных взаимодействий (табл. III.7, III.8). Их можно разделить на две субматрицы – константную,

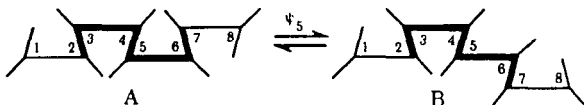
Таблица III 6

Относительная энергия ($U_{\text{общ}}$) и энергетические вклады ван-дер-ваальсовых ($U_{\text{вдв}}$),
электростатических ($U_{\text{эл}}$) и торсионных ($U_{\text{торс}}$) взаимодействий (ккал/моль)
предпочтительных оптимальных конформаций молекулы ангиотензина II

Группа	Номер кон- формации	Шейп	Конформация	$U_{\text{общ}}$	$U_{\text{вдв}}$	$U_{\text{эл}}$	$U_{\text{торс}}$
A	1	fe	$R_{23}B_{1212}R_{222}B_{212}R_{122}B_{31}RR_{11}$	0	-38,4	-3,5	4,2
	2	ff	$R_{23}R_{3222}R_{222}B_{212}R_{122}B_{31}RR_{11}$	0,9	-41,4	-0,9	5,5
	3	ff	$R_{21}R_{3222}R_{222}B_{212}R_{122}B_{31}BB_{31}$	3,5	-38,0	-1,4	5,2
	4	fe	$R_{23}B_{1212}R_{222}B_{212}R_{122}B_{31}BB_{31}$	4,0	-36,7	-0,3	3,1
B	1	ff	$R_{23}R_{3222}R_{222}B_{212}B_{222}B_{11}BB_{31}$	3,5	-38,4	0,9	3,2
	2	ee	$B_{21}B_{1222}R_{222}B_{212}B_{222}B_{11}BB_{31}$	3,7	-36,7	0,3	3,1
	3	fe	$R_{21}B_{1222}R_{222}B_{212}B_{222}B_{11}BB_{31}$	4,4	-36,8	0,5	3,0
	4	ee	$B_{21}B_{1222}R_{222}B_{212}B_{222}B_{11}RR_{11}$	4,6	-36,3	-1,1	4,3
	5	fe	$R_{23}B_{1222}R_{222}B_{212}B_{222}B_{11}RR_{11}$	6,0	-36,0	0,1	4,1
	6	ef	$B_{11}R_{2122}R_{222}B_{212}B_{222}B_{11}BB_{31}$	7,0	-34,1	0,8	2,6
C	1	$ff \text{ --- } efe \text{ --- } ee$	$R_{23}R_{3222}B_{122}R_{312}B_{222}B_{11}BB_{31}$	7,5	-33,2	0,2	2,8
D	1	$ff \text{ --- } eee \text{ --- } ee$	$R_{23}R_{3222}B_{222}B_{112}B_{222}B_{11}BB_{31}$	7,8	-33,7	0,7	3,2
E	1	$fe \text{ --- } fff \text{ --- } ef$	$R_{23}B_{1222}R_{222}R_{312}R_{222}B_{31}RR_{11}$	7,8	-32,0	-0,3	2,3
F	1	$ef \text{ --- } eff \text{ --- } ef$	$B_{23}R_{2122}B_{122}R_{312}R_{222}B_{31}RR_{11}$	8,0	-35,9	2,4	3,8

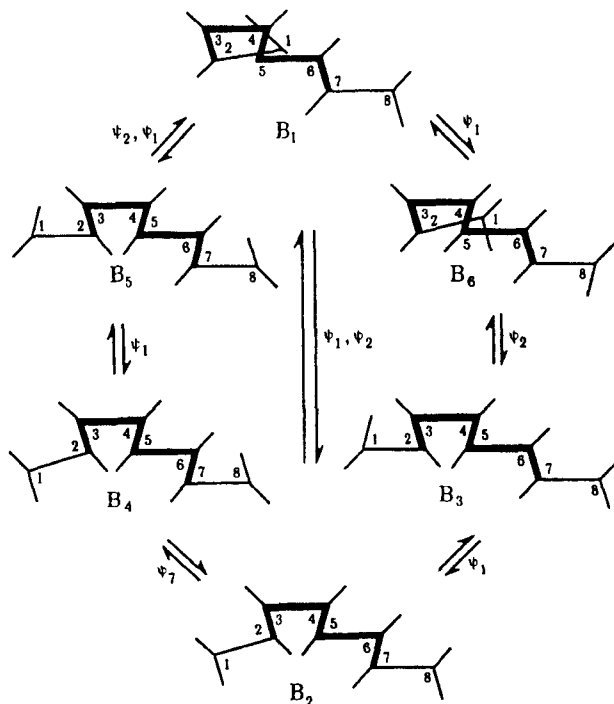


Р и с. III.7. Шейпы и пути взаимных переходов низкоэнергетических конформаций группы А молекулы ангиотензина II



Р и с. III.8. Взаимный переход конформации групп А и В молекулы ангиотензина II

отвечающую конформационно-жесткой нуклеации центрального тетрапептидного фрагмента (в таблицах она выделена), и переменную, зависящую от ориентаций лабильных N- и C-концевых дипептидных участков. Геометрия и энергия фрагмента Val³-His⁶ практически постоянны в конформациях каждой группы. В семействе А энергия стабилизации равна $\sim -12,0$ ккал/моль, а в В $\sim -10,0$ ккал/моль. Изменение при переходе от структуры фрагмента *fef* (А) к *fee* (В) обусловлено ослаблением взаимодействий между остатками His⁶, с одной стороны, и Val⁵, Tyr⁴ – с другой. Различия в энергии конформаций в пределах каждой группы определяются состояниями концевых дипептидов и их расположением относительно центрального тетрапептида. Самая выгодная по энергии конформация А имеет вытянутую зигзагообразную форму (см. рис. III.7); расстояние между концевыми атомами N и C составляет 15,1 Å. Наибольший вклад в стабилизацию А₁ вносит остаток Arg². Энергия его взаимодействий с другими остатками молекулы равна $-25,5$ ккал/моль (см. табл. III.7). Боковая цепь аргинина образует две водородные связи с карбоксильной группой Asp¹ и карбонильной группой Val⁵. Боковая цепь Asp¹ ориентирована в среду и электростатически взаимодействует лишь с положительно заряженной гуанидиновой группой Arg², энергия ее взаимодействия с остальной частью молекулы составляет всего 0,8 ккал/моль, и она к тому же имеет дестабилизирующий характер. Конформация А₂ с $\Delta U = \approx 0,9$ ккал/моль отличается от конформации А состояниями основной и



Р и с. III.9. Шейпы и пути взаимных переходов низкоэнергетических конформаций группы В молекулы ангиотензина II

боковой цепи Arg². Изменение двугранного угла ψ_2 этого остатка сближает концевые атомы N и C' до 6,1 Å и ведет к переориентации боковой цепи Arg². В конформации A₂ она ориентирована в сторону от молекулы и лишь слабо взаимодействует с другими остатками, за исключением остатка Asp¹ (соответственно -4,5 и -5,1 ккал/моль) (см. табл. III.7). Остаток Asp¹, напротив, обретает многочисленные стабилизирующие контакты, суммарный эффект которых составляет -15,5 ккал/моль. В частности, две его группы NH образуют водородные связи с группами CO остатков Tug⁴ и His⁶. Конформация A₂ имеет самую низкую энергию невалентных взаимодействий ($U_{\text{вдв}} = -41,4$ ккал/моль) (см. табл. III.6) и, следовательно, наиболее компактна. Однако она менее предпочтительна, чем A₁ и некоторые другие конформации, по энергии электростатических взаимодействий. Это обстоятельство делает поведение структур A₁ и A₂ альтернативным по отношению к природе окружения. Как известно, переход от полярной среды к неполярной сопровождается усилением водородных связей и электростатических взаимодействий. Поэтому конформационное равновесие ангиотензина II $A_1 \leftrightarrow A_2$ в сильно полярной среде будет смещено в сторону структуры A₂ со свободной боковой цепью Arg², а в неполярной – в сторону структуры A₁ со свободной боковой цепью Asp¹.

Группа В представлена шестью конформациями, энергия которых не

**Совмещенные треугольные матрицы энергий
внутри- и межостаточных взаимодействий валентно-несвязанных атомов (ккал/моль)
в конформациях A₁ и A₂ (верхняя и нижняя строка соответственно)**

	Asp ¹	Arg ²	Val ³	Tyr ⁴	Val ⁵	His ⁶	Pro ⁷	Phe ⁸
Asp ¹	0,1 -1,8	-11,5 -5,1	-0,2 -0,8	0,2 -3,3	0,1 -0,4	0,1 -2,4	0 -2,3	0,6 -1,2
Arg ²		0,4 -0,4	-1,7 -0,9	-2,7 -1,1	-3,2 -0,1	-1,2 -0,4	-2,3 -0,1	-2,9 -1,9
Val ³			0,5 0,5	-1,2 -1,2	-0,4 -0,4	-0,1 -0,1	0 0	-0,1 -0,1
Tyr ⁴				1,6 1,6	-3,3 -3,3	-4,8 -4,6	-0,4 -0,3	-0,3 -0,9
Val ⁵					0,9 0,9	-1,8 -2,1	-0,9 -0,5	-0,1 -0,1
His ⁶						-0,1 0,2	-2,5 -3,8	-4,9 -5,2
Pro ⁷							0,1 0,2	-1,7 -2,4
Phe ⁸								1,4 1,7

Примечание. Полу жирной линией обведена константная субматрица.

превышает 8,0 ккал/моль. Четыре из них практически изоэнергетичны ($U_{\text{общ}} = 3,5-4,6$ ккал/моль). Остановимся на описании конформаций B₁ и B₂ (рис. III.9, табл. III.6), отношения между которыми аналогичны отношениям A₁ и A₂. Они также отличаются друг от друга только состояниями N-концевого дипептида, близки по энергии и по тем ролям, которые играют остатки Asp¹ и Arg² в структурной стабилизации. В конформации B₁ первые четыре остатка образуют виток α-спирали, сближающий остаток аспарагиновой кислоты с центральной частью молекулы. В этом положении боковая цепь остатка Asp¹ в состоянии эффективно взаимодействовать почти со всеми звеньями цепи. Его группа NH образует водородную связь с карбонильной группой остатка Tyr⁴. Общий вклад Asp¹ в энергию межостаточных взаимодействий составляет -14,1 ккал/моль (см. табл. III.8). Остаток же Arg², как и в конформации A₂, оказывается фактически включенным из внутримолекулярных взаимодействий. Его боковая цепь направлена в сторону растворителя и имеет сравнительно слабые электростатические контакты с отрицательными зарядами Asp¹ и Phe⁸. В конформации B₂ роли Asp¹ и Arg² в структурной организации ангиотензина меняются. Первый лишается почти всех межостаточных взаимодействий и обретает конформационную свободу, а второй теряет ее и устанавливает стабилизирующие контакты в пределах всей молекулы (-21,7 ккал/моль). Структура B₂ предпочтительнее структуры B₁ по числу водородных связей и энергии электростатических взаимодействий. Поэто-

**Совмещенные треугольные матрицы энергий
внутри- и межстаточных взаимодействий валентно-несвязанных атомов (ккал/моль)
в конформациях В₁ и В₂ (верхняя и нижняя строка соответственно)**

	Asp ¹	Arg ²	Val ³	Tyr ⁴	Val ⁵	His ⁶	Pro ⁷	Phe ⁸
Asp ¹	-1,9	-5,5	-0,9	-2,9	-0,4	-2,6	-0,1	-1,7
	-0,5	-2,6	-0,2	0,1	0	0	0	-0,1
Arg ²		-0,5	-0,7	-1,1	-0,1	-0,4	0	-1,6
		-0,1	-1,8	-2,5	-3,0	-5,4	-0,3	-6,1
Val ³			0,5	-1,2	-0,6	0	0	0
			0,4	-1,1	-0,5	-0,1	0	0
Tyr ⁴				1,2	-3,9	-3,4	-0,1	0,1
				1,4	-4,0	-3,5	0	0,3
Val ⁵					0,5	-0,5	-0,4	-0,5
					0,7	-0,6	-0,5	-0,1
His ⁶						-0,5	-4,3	-3,7
						-0,5	-4,4	-1,5
Pro ⁷							0,2	-1,4
							0,3	-1,7
Phe ⁸								0,7
								0,8

Примечание. Полужирной линией обведена константная субматрица.

му она может доминировать над В₁ в менее полярных средах или при гидрофобных контактах ангиотензина с рецептором.

Таким образом, решение прямой задачи для ангиотензина II позволяет утверждать, что структурная организация молекулы описывается набором низкоэнергетических, легко переходящих друг в друга конформационных состояний нескольких семейств. Энергетически и энтропийно наиболее предпочтительны состояния семейств А и В. Геометрические параметры их лучших представителей (А₁, В₁) приведены в работе [32].

Естественно желание теоретиков – сопоставить результаты своих расчетов с опытными данными. Однако эта простая процедура в данном случае невыполнима по ряду причин принципиального и методологического характера. Существующие физико-химические методы исследования пространственного строения олигопептидов являются не прямыми, а косвенными. Поэтому данные теоретического анализа приходится сравнивать не с наблюдаемыми непосредственно фактами, а с результатами их обработки, которая из-за несовершенства соответствующих теорий вносит в трактовку фактов элемент субъективности. Возможности используемых методов в данном случае неадекватны самой постановке задачи, заключающейся в определении геометрии ряда конформаций довольно сложной молекулы и в оценке вероятности их реализации в различных условиях. Получение информации в таком объеме, а именно это требуется для последующего изучения структурно-функциональной организации природ-

ного пептида, находится за пределами чувствительности и интерпретационных возможностей физико-химических методов.

Таким образом, вопрос о правильности решения прямой структурной задачи природного олигопептида не может быть решен путем прямого сопоставления рассчитанных и экспериментальных конформационных параметров. Непротиворечивость результатов теоретического анализа всем имеющимся опытным данным, хотя и является положительным фактором, тем не менее не может служить строгим критерием правильности априорного предсказания конформационных возможностей природных олигопептидных молекул. Отсутствие совпадения, как это ни парадоксально, также не является бесспорным доказательством нереальности результатов расчета. На сегодняшний день ни один из существующих методов исследования пространственного строения молекул не позволяет однозначно и полно описать не только весь набор низкоэнергетических конформаций природного олигопептида, но даже одно доминирующее в растворе конформационное состояние молекулы. Этот вывод следует из анализа экспериментальных данных всех структурных исследований природных олигопептидов, и прежде всего ангиотензина II, изученного в этом отношении наиболее детально и широко.

Рассмотрим оценки, сделанные опытным проявлением молекулярных свойств ангиотензина II и попытаемся составить общее представление о характерных особенностях структурной организации гормона, а затем сравнить его с представлением, следующим из теоретического анализа. Противоречивыми оказались первые же исследования структуры ангиотензина II методом диализа на тонких пленках. В одних работах [33, 34] сделан вывод о том, что молекула гормона в растворе имеет одну компактную форму, а в другой [8] предположено наличие конформационного равновесия двух форм. Не менее противоречивы выводы разных авторов из кинетических данных по изотопному замещению протона в водородных связях ангиотензина II. Г. Шерага и соавт. [15] отмечают одинаковую скорость обмена всех амидных протонов и делают вывод о том, что конформационное состояние гормона отвечает статистическому клубку. Р. Ленкинский и соавт. [35] отмечают аномально низкую скорость обмена амидного протона His⁶, а М. Принтц и соавт. [24, 36] выделяют по этой же причине остатка Val³ и Val⁵. В работе [25] амидные протоны разделены по скорости обмена на три группы, причем к группе с наибольшими скоростями отнесены протоны Asp¹ и Arg². В классификации, предложенной Г. Маршаллом [37], все обменивающиеся протоны разделены на четыре группы. К одной группе отнесены амидные протоны всех остатков ангиотензина II, за исключением Asp¹ и Phe⁸, имеющие, согласно сообщению [37], одинаковую скорость обмена. По значениям констант диссоциации ионогенных групп гормона, полученных потенциометрическим титрованием [9] и с помощью спектров ЯМР и КД [38], сделан вывод о сближенности N- и C-концевых групп пептидной цепи, допускающей их взаимодействие. Расстояние между группами значительно меньше соответствующего расстояния в случае пребывания ангиотензина в состоянии статистического клубка. В работе [38], кроме того, предположено, что все ионогенные группы доступны растворителю, а имидазольное кольцо остатка

His⁶ взаимодействует с фенильным кольцом остатка Tyr⁴ и удалено от остатка Phe⁸. Р. Уэйнкам и Е. Джоргенсен, напротив, считают, что структура ангиотензина II стабилизируется ион-дипольным взаимодействием $\geq N^+H \dots ^-OOC$ сближенных остатков His⁶ и Phe⁶ [16]. Спектры ДОВ и КД, по мнению С. Ферманджяна и соавт. [39, 40], свидетельствуют о наличии в молекуле ангиотензина II антипараллельной β -структуры. Подобным же образом интерпретируются ими колебательные спектры гормона [12].

Ряд работ посвящен исследованию спектров ЯМР ангиотензина II, дающих наибольшую информацию о пространственном строении молекулы. Однако единства в интерпретации экспериментальных данных нет и здесь. Одни авторы [41] считают, что спектры свидетельствуют о существовании ангиотензина II в растворе в одной конформации, имеющей преимущественно вытянутую форму. Другие [42] делают вывод о том, что молекула имеет свернутую форму, в которой ароматические боковые цепи остатков Tyr⁴ и His⁶ располагаются параллельно друг другу и эффективно взаимодействуют, а карбонильная группа остатка Asp¹ образует водородную связь с аминогруппой остатка Tyr⁴. Изучение времени ¹³C-спин-решеточной релаксации привело авторов работы [43] к выводу о наличии большой конформационной подвижности первых двух остатков и отсутствии β -изгиба у этой части молекулы. Авторы работы [44], используя тот же метод, пришли к иному заключению. Они считают, что все остатки ангиотензина II, за исключением остатка Tyr⁴, имеют примерно одинаковую конформационную свободу; в наибольшей степени ограничена подвижность боковой цепи остатка Tyr⁴, взаимодействующей с многими остатками молекулы. Вицинальные константы всех остатков ангиотензина II [36, 45, 46] имеют значения, удовлетворяющие любым величинам ϕ , ψ каждого остатка в низкоэнергетических областях R, V и, следовательно, ²⁷ комбинациям конформационных состояний остатков в пептидной цепи молекулы. Всего для молекулы ангиотензина на основе экспериментальных данных, главным образом спектров ЯМР, было предложено не менее десяти различных моделей (см. [22, 26, 27]).

Несмотря на существенно различающиеся, а часто взаимоисключающие друг друга трактовки опытных данных, полученные результаты, как нам кажется, позволяют сделать ряд заключений общего характера о структурной организации ангиотензина II, не противоречащих известным фактам. Во-первых, пространственное строение ангиотензина II в растворе отвечает плотно упакованной структурной организации молекулы, а не флуктуирующему статистическому клубку. Во-вторых, среди доминирующих в растворе конформаций гормона имеются структуры, в которых часть пептидной цепи образует виток спирали, или так называемый β -изгиб. В-третьих, сложная сеть внутримолекулярных контактов, стабилизирующих низкоэнергетические конформации ангиотензина II, включает в себя взаимодействия боковых цепей ароматических остатков Tyr⁴ и His⁶ и систему водородных связей. Напрашивается еще один вывод о структурной организации ангиотензина II, вытекающий из факта существования столь противоречивых трактовок опытных данных. Такой широкий разброс мнений свидетельствует, хотя бы отчасти, о наличии в растворе

**Количество совпадающих по форме основной цепи
низкоэнергетических конформаций, рассчитанных в работах [22, 47–50]**

Литературный источник	Де Коэн, Ралстон (1977 г.) [47]	Галактионов, Никифорович и др. (1979 г.) [22]	Никифорович, Галактионов, Чипенс (1983 г.) [48]	Марчионини, Мейгзети, Премила (1983 г.) [49]	Никифорович, Вейстерман и др. (1987 г.) [50]
[47]	10	1	1	2	0
[22]	1	6	4	0	2
[48]	1	4	5	0	2
[49]	2	0	0	5	0
[50]	0	2	0	0	6

не одной, а ряда близких по энергии пространственных форм молекулы ангиотензина и высокой чувствительности положения конформационного равновесия к изменению внешних условий.

Рассчитанный Т.В. Гогитидзе и автором данной монографии [32] набор низкоэнергетических конформаций октапептидного гормона (см. табл. III.6) соответствует составленному на основе имеющихся опытных данных представлению о его структурной организации. Однако такое совпадение не является серьезным доводом в пользу результатов теоретического анализа. Сравним данные нашей работы с результатами аналогичных расчетов этого же гормона других авторов. В табл. III.9 сопоставлены результаты независимых расчетов пространственного строения ангиотензина II, выполненных разными авторами в разное время [22, 47–50]. Сопоставление показывает, что найденные для одного и того же гормона наборы низкоэнергетических конформаций существенно различаются между собой. Между тем все они, как и результаты нашего расчета, не противоречат данным экспериментальных исследований. Причины столь значительных расхождений отмечены в монографии [51] и в главах 10, 14 этой книги. Ниже остановимся на некоторых особенностях подхода С.Г. Галактионова и соавт. [22, 48] к конформационному анализу природных олигопептидов. С моей точки зрения, он более последователен в решении прямой структурной задачи, чем подходы, использованные в работах [47, 49].

С целью уменьшения числа рассматриваемых конформаций при одновременном расширении критического интервала энергии С.Г. Галактионов и соавт. [22, 48] предварительно рассматривают модели, в которых все аминокислотные остатки, кроме Arg и Pro, заменены остатками аланина. Далее для модельного пептида определяются все возможные оптимальные конформации, лучшие из которых служат затем исходными структурными вариантами основной цепи реального пептида. В основе такой процедуры лежит принципиально неправильное, по моему мнению, предположение о доминирующем значении основной цепи в определении конформационных возможностей пептидов. Если бы это было так и составляющая пептидный остов в среднем треть всех атомов действительно детерминировала

положения остальных двух третей атомов, принадлежащих боковым цепям, все природные олигопептиды и белки должны были бы иметь одинаковые формы основной цепи или очень ограниченное их количество. Что же касается синтетических олиго- и полипептидов, построенных из остатков глицина и аланина, фактически лишенных боковых цепей, то их пространственное строение в таком случае должно было бы описываться единичными жесткими структурами, а не состоянием статистического клубка, что имеет место в действительности. Предположение С.Г. Галактионова и соавт. [22, 48] далеко от реальной картины. Вариации пространственных форм основной цепи у белков столь же множественны, как и вариации порядка расположения в этой цепи 20 стандартных аминокислотных остатков. И в первой и во второй стадии расчета, где авторы ведут поиск для выбранных пространственных форм основной цепи оптимальной взаимной ориентации боковых цепей исследуемого пептида, акцент делается главным образом на электростатические взаимодействия ионогенных групп, считая их главным фактором структурной стабилизации. С этим также трудно согласиться, поскольку укладка пептидной цепи в нативную конформацию или (при наличии, как в случае олигопептидов, ряда низкоэнергетических структур) установление конформационного равновесия происходит в водном растворе при физиологических условиях, препятствующих эффективному электростатическому взаимодействию, почти полностью сводя его на нет ($\epsilon = 81$).

Характерная особенность всех теоретических исследований пространственного строения ангиотензина II [22, 47–50] – отсутствие какой-либо классификации конформационных состояний молекулы, не говоря уже о такой, которая была бы обоснована с физической точки зрения и охватывала все возможные структурные варианты, систематизированные в соответствии с субординационными взаимоотношениями по таксономическим категориям. Отсутствие классификации – объективный признак непонимания самых существенных свойств изучаемых соединений, определяющих их единство и различие. Без структурной классификации, четко сформулированных принципов общей теории и физической модели (также отсутствующих в обсуждаемых работах) невозможен объективный выбор конформационных состояний. Все оценки оптимальных конформаций в расчетах Галактионова, Шераги, Де Козна и соавторов выполнены на основе относительных величин общей энергии, без количественного анализа вкладов от отдельных внутри- и межостаточных взаимодействий в структурных вариантах всевозможных форм различных типов основной цепи. Поэтому результаты подобных расчетов не гарантированы от случайных пропусков и от неправильных оценок полученных данных. Подтверждением такому заключению является табл. III.9. Все структуры, найденные в обсуждаемых работах для ангиотензина II, автоматически входили в процедуру изложенного здесь расчета, но не попали в окончательный набор конформаций (см. табл. III.9), так как оказались менее предпочтительными по энергии. В то же время найденные в [32] низкоэнергетические конформации молекулы вообще оказались не замеченными авторами работ [22, 47–50].

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЦИСТИНСОДЕРЖАЩИХ ПЕПТИДОВ

Перед тем как продолжить обсуждение количественных данных о структурной организации природных олигопептидов, необходимо сказать несколько слов о некоторых особенностях исследований пространственного строения этих соединений, о возможностях экспериментального подхода и расчетных методов, о достоверности обсуждаемых результатов теоретического конформационного анализа. Отношение к теоретическим, расчетным данным, естественно, зависит от убежденности в том, что они если и не всегда количественно, то, во всяком случае, качественно правильно отражают наиболее характерные черты опытных фактов, явлений, закономерностей. Объективное представление о точности априорно рассчитываемых геометрических параметров молекул приобретает в данном обсуждении особый смысл, поскольку именно теоретический подход должен стать основой строгого решения необычных по своей общности, научной и практической значимости задач структурной и структурно-функциональной организации природных пептидов и белков.

10.1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К КОНФОРМАЦИОННОМУ АНАЛИЗУ ПЕПТИДОВ

Реальность расчета пространственного строения олигопептидов, казалось бы, легко может быть выяснена прямым сопоставлением теоретических результатов с опытными данными. Однако эта обычно столь простая процедура в данном случае чаще всего оказывается невыполнимой по ряду причин принципиального и препаративного характера. Кроме того, из-за недостаточной чувствительности и некоторых других ограничений, присущих известным экспериментальным структурным методам, сопоставление теории и опыта во многих случаях не имеет того решающего значения, которое ему придается традиционно. Начнем с рассмотрения возможностей рентгеноструктурного анализа олигопептидов. В изучении пространственного строения низкомолекулярных пептидов применимость этого метода более ограничена даже по сравнению с белками. Олигопептиды обладают повышенной конформационной лабильностью, и получение их в кристаллической форме является трудноразрешимой задачей. Но даже если удастся вырастить пригодные для рентгеноструктурного анализа кристаллы и получить дифракционную картину, возникают серьезные осложнения с ее интерпретацией. Для расшифровки рентгенограммы нельзя, например, воспользоваться методом изоморфного замещения, поскольку внедрение тяжелых атомов в образующие кристаллическую решетку олигопептидные молекулы искажает их строение, т.е. в данном случае в отличие от белков метод не является действительно изоморфным. В то же время олигопептиды слишком сложны для использо-

Таблица III 10

**Теоретические и экспериментальные значения двугранных углов
основных цепей молекул *LDLDLD*-циклогексадепептидов
и *LDLD*-циклотетрадепептидов**

Молекула	Двугранный угол, град																	
	φ_1	ψ_1	ω_1	φ_2	ψ_2	ω_2	φ_3	ψ_3	ω_3	φ_4	ψ_4	ω_4	φ_5	ψ_5	ω_5	φ_6	ψ_6	ω_6
Цикло-[-(MeAla-Lac) ₃ -] (расчет [64])	-103	171	180	74	-136	180	-103	171	180	74	-136	180	-103	171	180	74	-136	180
Цикло-[-(MePhe-Hyiv) ₃ -] (рентген [63])	-103	167	180	74	-133	179	-101	166	-177	73	-164	178	-78	157	178	90	-136	-179
Цикло-[-(MeAla-Lac) ₂ -] (расчет [62])	-100	125	180	73	47	0	-100	125	180	73	47	0						
Цикло-[-(MePhe-Hyiv) ₂ -] (рентген [61])	-98	136	175	70	44	0	-102	129	177	82	39	2						

вания прямого метода рентгеноструктурного анализа, обычного в исследованиях простых органических молекул. Тем не менее такие данные удалось получить не только для ди- и трипептидов, но в ряде случаев для более сложных молекул, например [Met⁵]- и [Leu⁵]-энкефалинов [52–57] и дезаминоокситоцина [58, 59]. Лучше кристаллизуются и легче поддаются расшифровке относительно жесткие макроциклические природные и синтетические олигопептиды и олигодепсипептиды, такие, как грамицидин S, антаминид, энниатин В, валиномицин и их комплексы с ионами металлов [60]. Некоторые из этих опытных структур можно сопоставить с априорно полученными результатами теоретического конформационного анализа. Для оценки объективности расчетных данных такое сравнение особенно показательно, поскольку расчет был проведен на несколько лет раньше рентгеноструктурного анализа тех же объектов.

Конформационный анализ циклических тетрадепсипептидов [–(Gly–Glyco)₂–], [–(MeAla–Lac)₂–] и [–(MeVal–Hyiv)₂–], состоящих из регулярно чередующихся остатков α-амино- и α-гидроксикислот с различными наборами конфигураций атомов C^α (DDDD, DDDL, DDLL, DLLD, LDLD и LDDD), свидетельствуют о наибольшей устойчивости для этих молекул *цис-транс-цис-транс*-конфигурации основной цепи, причем пептидные группы имеют *цис*-, а сложноэфирные – *транс*-конфигурации. Кроме того, расчет показал, что введение заместителей при C^α и N-метилирование лишь сужают круг разрешенных конформаций, не приводя к появлению новых. Рентгеноструктурный анализ полностью подтвердил эти заключения, а найденные с его помощью геометрические параметры четырех диастереоизомеров цикло-[–(MeVal–Hyiv)₂–] с асимметрией атомов C^α LDLD, DLLD, DDDL и LDD [61] количественно совпали с теоретическими параметрами предпочтительных по энергии конформаций соответствующих молекул [62]. Не менее удовлетворительное совпадение имеется между кристаллическими структурами энниатина В и основной цепи боверицина [63], с одной стороны, и рассчитанной применительно к полярному окружению самой низкоэнергетической конформацией (Р) энниатина В [64] – с другой.

Представление о близости теоретических и опытных значений геометрических параметров молекул циклотетра- и циклогексадепсипептидов дает табл. III.10. В неполярной среде энниатин В, согласно теоретическому анализу, должен принять иную структуру (N₁). Этот результат также хорошо согласуется с опытными данными, о чем можно судить по близости теоретического и экспериментального значений дипольного момента – параметра, чувствительного в данном случае к пространственному строению молекулы. Удовлетворительно совпадают результаты теоретического конформационного анализа LLLLLL- и LDLLDL-изомеров энниатина В [64] с данными рентгеноструктурного анализа, дисперсии оптического вращения и метода дипольных моментов [65, 66]. Таким образом, во всех случаях, где можно провести прямое сопоставление теории с экспериментом, наблюдается хорошее количественное согласие результатов. Однако расчетных и опытных данных, касающихся одних и тех же объектов, немного. Итак, принципиальным ограничением рентгеноструктурного анализа является невозможность даже при благоприятных условиях описать

более одной из разрешенных конформаций молекулы, не обязательно глобальной в растворе.

При исследовании пространственного строения олигопептидов в растворе широко используются физико-химические, и прежде всего оптические и резонансные спектральные методы. Однако и здесь, как показывает пример с ангиотензином II (см. гл. 9), структурная проблема этих соединений остается нерешенной. Выше отмечалось, что в данном случае по сравнению с белками усложняется формулировка самой проблемы. Для последующего изучения структурно-функциональной зависимости требуется найти уже не одну конформацию молекулы, а установить положение конформационного равновесия, т.е. определить геометрию ряда структур и оценить вероятность их реализации в различных условиях. Получение такой информации, как правило, находится за пределами чувствительности и интерпретационных возможностей существующих физико-химических методов. Этот вывод очевиден из анализа данных практически всех исследований структуры олигопептидов, проведенных с помощью физико-химических методов. Например, к расшифровке пространственного строения октапептидного гормона ангиотензина II был привлечен практически весь комплекс имеющихся методов: ^1H - и ^{13}C -ЯМР, ЭПР, ДОВ и КД, ИК- и раман-спектроскопия, флуоресцентный метод, изотопный обмен и др. (см. гл. 9). В результате было предложено семь совершенно различных моделей пространственной структуры молекулы, отвечающих данным одного или сразу нескольких методов. Однако ни одна из этих моделей не удовлетворяет всей совокупности экспериментальных фактов. Подобная неопределенность свойственна трактовкам многочисленных экспериментальных данных, касающихся нейрогипофизарного гормона окситоцина, хотя в данном случае изучение структуры облегчалось наличием дисульфидной связи между первым и шестым остатками. Наиболее детально рассмотрены спектры ЯМР нонапептидного гормона и его аналогов в различных растворителях, а также свободных циклического гексапептидного и линейного С-концевого фрагментов. Кроме того, для окситоцина получены кривые КД, раман-спектры и исследована кинетика дейтерообмена пептидных протонов. В результате были установлены некоторые структурные особенности молекулы: ориентация связей $\text{C}^\beta - \text{S}$ в дисульфидном мостике, *транс*-конфигурация пептидной $\text{Cys}^6\text{-Pro}^7$, интервалы возможных значений двугранных углов вращения вокруг связи $\text{NH-C}^\alpha\text{H}$, система внутримолекулярных водородных связей. Тем не менее вся совокупность полученных опытных данных не позволила сделать обоснованных количественных заключений о геометрии молекулы окситоцина и ее конформационных возможностях. Предложенная в работе Л. Джонсона с соавт. [67] структурная модель носит в значительной степени качественный характер. Спорным представляется подход к конформационному исследованию окситоцина, вазопрессина и других нейрогипофизарных гормонов, использованный Б. Хеннигом с соавт. [68]. Во-первых, он основан на методе статистического анализа Е. Каба и Т. Ву [69], обладающего малой достоверностью предсказания. Во-вторых, поиск базируется на предположении о совпадении пространственного строения всех нонапептидных гормонов. Такое предположение не является очевидным,

поскольку исследованные молекулы отличаются природой аминокислотных остатков в положениях 3, 4 и 8 и имеют разную биологическую активность, что может быть обусловлено их различными конформационными свойствами. Столь же неудачной следует признать попытку Д. Котельчука, Г. Шераги и Р. Уолтера [70] уточнить пространственное строение окситоцина, приняв за основу модель Уолтера. Основная экспериментальная информация, использованная в указанных работах для построения стерически разрешенных молекулярных моделей, — это величины вицинальных констант $^3J_{\text{NH}-\text{C}^\alpha\text{H}}$, которые определяют для каждого двугранного угла вращения $\phi(\text{N}-\text{C}^\alpha)$ не одну, а несколько областей возможных значений. Как справедливо отмечено в работе [15], наблюдаемым величинам вицинальных констант только N-концевого гексапептидного фрагмента окситоцина одновременно удовлетворяют не менее тысячи структурных вариантов этого участка молекулы, причем многие из них могут быть циклическими. В исследованиях окситоцина и ангиотензина обсуждается лишь форма основной цепи, а конформационные состояния боковых цепей, в значительной мере определяющих ее, почти нигде не рассматриваются.

Примеры с ангиотензином и окситоцином, пространственное строение которых всесторонне изучалось с помощью физико-химических методов, убедительно демонстрируют ограниченность чисто эмпирического подхода к решению структурной проблемы олигопептидов. Рассчитывать на успех здесь можно только в случае объектов с незначительной конфигурационной подвижностью. Одним из немногочисленных примеров детальной и обладающей доказательной силой расшифровки пространственной структуры олигопептидов в растворе может служить исследование циклического антибиотика валиномицина [71]. Но и здесь существенную помощь в интерпретации опытных данных, особенно спектров ЯМР, оказали результаты теоретического конформационного анализа. Независимо определить конформацию олигопептида только по данным опытных измерений, а тем более решить на этой основе структурную задачу в требуемом объеме, т.е. найти геометрию всего набора вероятных конформаций и оценить динамические свойства молекулы, однозначно пока нельзя. При современном состоянии экспериментальных исследований пространственного строения пептидов, если речь не идет о рентгеноструктурном анализе кристаллических образцов или электронной микроскопии высокого разрешения, вопрос о достоверности теоретических данных не может быть окончательно решен прямым сопоставлением результатов расчета и опыта. Во-первых, определяемые с помощью физико-химических методов геометрические параметры молекулы не являются непосредственно измеряемыми, действительно опытными величинами. Все оптические и резонансные методы дают о молекулярной структуре не прямую, а косвенную информацию, причем связь между наблюдаемыми характеристиками спектра и геометрией молекулы часто неоднозначна и не всегда достаточно хорошо известна. Соответствующие зависимости обычно устанавливаются эмпирическим путем, не имеют строго теоретического обоснования, и, как правило, представление о границах их применимости отсутствует. Во-вторых, из-за природы самого эффекта (ЯМР, изотопный обмен и др.) или

по ряду технических причин, например наложения спектральных полос (ДОВ, КД, ИК- и раман-спектроскопия), данные экспериментальных измерений часто являются усредненными. В этих случаях определяемые на их основе значения геометрических параметров отвечают не отдельным предпочтительным пространственным структурам молекулы, а сразу всему набору находящихся в равновесии конформаций. В-третьих, физико-химические методы неодинаково чувствительны к пространственной структуре всей молекулы и расположению в ней отдельных элементов. Экспериментальные данные одних методов отражают состояние тех или иных атомных групп и мало что говорят о состоянии других групп или о структуре в целом. Так, например, трактовка спектров ^1H -ЯМР позволяет получить определенную, хотя и не однозначную информацию об угле вращения вокруг связи $\text{N}-\text{C}^\alpha(\phi)$ и в то же время не дает сведений об угле вращения вокруг второй связи основной цепи – $\text{C}^\alpha-\text{C}(\psi)$. Флуоресцентный анализ идентифицирует лишь состояния ароматических боковых цепей аминокислотных остатков, а ЭПР – только заряженных групп. В подобных случаях количество экспериментальных данных всегда оказывается недостаточным для корректного описания пространственного строения. Тем не менее, для того чтобы логически завершить исследование, авторы привлекают косвенные факты, строят атомные модели, делают дополнительные предположения. Все это может привести к необоснованным, а иногда ошибочным заключениям. Примером подобных работ служит исследование структуры апамина с помощью спектра ЯМР [72]. Другие физико-химические методы (малоугловое рентгеновское рассеяние, измерение вязкости и др.), напротив, дают представление об усредненной молекулярной форме и не чувствительны к деталям строения. Спектроскопия ДОВ и КД относится к тем редким методам, благодаря которым одновременно проявляются конформационные состояния локальных участков пептидной цепи и их взаимное расположение в общей структуре молекулы. Однако из-за недостаточной разработанности теорий соответствующих эффектов возможности обоих методов остаются не реализованными. Использование для интерпретации кривых ДОВ и КД эмпирических корреляций не решает проблему и, как показывает опыт, не гарантирует от ошибок. Напомним в этой связи случай с исследованием пространственного строения грамицидина S. Полученные для него спектры КД оказались идентичными спектрам α -спиральной структуры, абсолютно нереальной для циклического декапептида с чередующимися *L*- и *D*-аминокислотными остатками, каким является данный антибиотик.

По причинам, отмеченным выше, хорошее совпадение результатов конформационного анализа со всеми имеющимися опытными данными, хотя и является положительным фактом, не может служить строгим критерием правильности теоретического предсказания пространственного строения пептидных молекул. С другой стороны, отсутствие совпадения, как это ни парадоксально, также еще не означает бесспорного доказательства нереальности результатов расчета. В последующем изложении будет показано, что при изучении структурно-функциональной зависимости природного олигопептида прежде всего необходимо иметь представление о всем наборе его низкоэнергетических конформаций, поскольку толь-

ко среди них могут находиться биологически активные формы молекулы. При изменении окружения происходит энергетическое перераспределение структур внутри этого набора, т.е. смещение положения равновесия между одними и теми же конформационными состояниями. Сопоставляя опытные и теоретические данные, следует иметь в виду, что конформационное равновесие олигопептидов чувствительно к вариации внешних условий, и нельзя придавать серьезного значения отсутствию совпадения результатов расчета, выполненного, например, применительно к сильнополярной среде, с экспериментальными данными, полученными для пептида в ином окружении. В случае же корректного сопоставления несовпадение теоретических и опытных данных может быть вызвано причинами, не играющими определяющей роли. Четко наблюдаемое различие будет иметь место, например, при правильном определении всего набора низкоэнергетических конформаций и удовлетворительной оценке геометрии каждого состояния, но при неполном соответствии теоретически найденного расположения конформаций в шкале энергии действительному порядку (достаточна разница в 1,5–2,0 ккал/моль). Если первый момент является принципиальным для изучения функции, то последний не представляется столь уж необходимым.

Итак, рассмотрение современного состояния экспериментального изучения пространственного строения природных олигопептидов можно резюмировать следующим образом.

1. Существующие физико-химические методы исследования структуры олигопептидов не являются универсальными в отношении выбора объекта.

2. Непосредственно получаемые с помощью экспериментальных методов данные, за редким исключением, являются косвенными, неоднозначными и усредненными характеристиками конформационных состояний олигопептидов.

3. На основе опытных данных в настоящее время нельзя получить достаточно полного количественного представления о пространственном строении природных олигопептидов в нативном состоянии.

4. Используемый эмпирический подход к поиску структурно-функциональной организации в принципе, а не только в силу сложности объектов исследования, не может обеспечить как в качественном, так и в количественном отношении получение всей необходимой информации о пространственной организации и динамических конформационных свойствах молекул природных олигопептидов.

5. При оценке достоверности результатов теоретического конформационного анализа олигопептидов данные отдельных физико-химических методов и их комплекса во многих случаях нельзя считать надежным критерием.

Сложившаяся ситуация в области конформационных исследований и изучения структурно-функциональной организации олигопептидов диктует необходимость широкого использования теоретического подхода, что, в свою очередь, делает чрезвычайно актуальным контроль получаемых результатов. Однозначное решение вопроса, как отмечалось, не может быть получено простым сопоставлением расчетных конформаций со

структурными характеристиками молекул, найденными опытным путем с привлечением эмпирических корреляций. Подчеркнем, что в задачу этой главы, как и всей книги, не входило детальное рассмотрение многочисленных физико-химических методов исследования пространственного строения и конформационной подвижности пептидных молекул. Выше дана лишь общая оценка сегодняшней ситуации, которая по мере совершенствования методов может быстро и неожиданным образом меняться. Цель заключалась в ином: во-первых, в демонстрации самоценности теоретического конформационного анализа и уникальности предоставляемой им информации, которая недоступна при использовании экспериментального и эмпирического подходов, и, во-вторых, в выделении специфических особенностей, проявляющихся при сопоставлении результатов расчета с опытными данными о структурах лабильных и достаточно больших олигопептидов.

Для проверки теории пространственной организации олигопептидов, физической молекулярной модели и расчетной схемы априорного конформационного анализа были использованы два подхода. Первый из них не требует для оценки результатов расчета знания экспериментальных фактов о пространственной структуре молекулы. Он основан на выборе для теоретического исследования таких объектов, расчет которых содержит внутренний, автономный контроль своих результатов. Как показано ниже, можно считать с высокой степенью вероятности, что решение конкретной задачи при наличии подобного контроля доводится до конца только при получении правильных результатов. Во втором случае достоверность метода подтверждается путем сопоставления данных теоретического конформационного анализа олигопептидных фрагментов с геометрией соответствующих участков трехмерной структуры белка, установленной с помощью рентгеноструктурного анализа. Поскольку разработанная автором конформационная теория белковых молекул включает все элементы теории пространственной организации олигопептидных молекул, то полное совпадение расчетной конформации с нативной структурой белка можно считать убедительным доказательством справедливости теоретического подхода к априорному расчету пространственного строения не только природных полипептидов, но и олигопептидов.

Согласно термодинамической гипотезе К. Анфинсена [73], предпосылки для окисления атомов серы цистеинов, образующих в пептидах дисульфидные мостики, обусловлены стерической предрасположенностью соответствующих участков аминокислотной последовательности к таким конформационным состояниям, в которых остатки Cys оказываются сближенными, а их боковые цепи имеют необходимую для создания S-S-связи взаимную ориентацию. В процессе свертывания пептидной цепи сближенность цистеинов в самых низкоэнергетических конформациях линейной последовательности достигается за счет стабилизирующих невалентных взаимодействий между всеми остатками цепи. Таким образом, предполагается, что механизм спонтанной самоорганизации нативной структуры пептида является не чисто статистическим, а статистико-детерминированным, причем стерически разрешенными или самыми предпочтительными становятся только взаимодействия между определенными парами остат-

ков Cys. При априорном многостадийном конформационном анализе сложного пептида автоматический приход на завершающем этапе расчета к наиболее низкоэнергетическим конформациям линейной последовательности с близкими контактами между остатками Cys, образующими по химическим данным дисульфидную связь, можно ожидать только при справедливости всех положенных в основу расчета положений теории и правильном количественном описании конформационного состояния молекулы. Предсказать заранее конформацию пептидной цепи, ведущей к нужной взаимной ориентации остатков Cys, не представляется возможным. В этой связи интерес представляет априорное исследование пространственного строения и конформационных возможностей таких сложных олигопептидов, как апамин, тертиапин, MCD-пептид и инсектотоксин I₁. Однако только проверкой достоверности результатов анализа не исчерпывается значение изучения конформационных возможностей молекул таких соединений. При правильности определения их структур полученные данные будут мощным импульсом движения к главной цели – проблеме структурной организации белков.

Существование достаточно стабильных конформаций, которое наблюдалось даже у сравнительно небольших брадикининпотенцирующих пептидов (БПП₅, БПП₉, БПП₁₀) и ангиотензина, позволяет сделать существенное, далеко идущее предположение о возможности образования на некоторых участках белковой последовательности только под влиянием средних взаимодействий конформационно жестких структур – нуклеаций. Поскольку свертывание полипептидной цепи в компактную глобулу невозможно, если она состоит только из созданных средними взаимодействиями нуклеаций, то логично допустить, что в белковой последовательности наряду с ними имеются также конформационно более лабильные участки. В этом случае взаимодействия между остатками внутри того или иного фрагмента выделяют не единичные конформационные состояния, а более или менее ограниченный спектр приблизительно равновероятных (по средним взаимодействиям) состояний. Развивая дальше эту мысль, можно предположить, что учет средних взаимодействий в белковой цепи приведет к идентификации нуклеаций и конформационно лабильных участков. Свертывание цепи в глобулярную форму происходит под действием дальних взаимодействий. Их функция по отношению к нуклеациям заключается в дополнительной стабильности и корректировке конформационных состояний некоторых боковых цепей, а по отношению к лабильным фрагментам – к выбору из наборов равновероятных по средним взаимодействиям состояний единственных конформаций, обеспечивающих сближенность комплементарных друг другу нуклеаций. Доказательство справедливости предположения об образовании нуклеаций и о согласованности всех внутримолекулярных взаимодействий в глобуле имеет принципиальное значение для решения структурной проблемы белка, так как в этом случае становится возможным представить проблему в виде последовательно решаемых проблем ближних, средних и дальних взаимодействий.

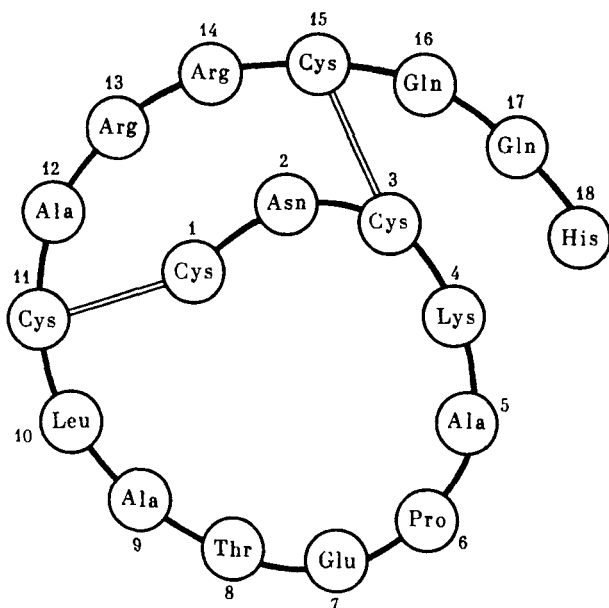
Молекулы цистинсодержащих олигопептидов – апамина, тертиапина, MCD-пептида и инсектотоксина I₁ представляют удобными объектами для проверки высказанного предположения о согласованности всех взаимо-

действий в белке. Их аминокислотные последовательности сложны и включают конформационно жесткие и лабильные участки. В формировании структур здесь принимают участие не только средние, но и дальние взаимодействия. Расчет дает возможность количественно оценить вклады этих взаимодействий, выяснить соотношение между ними и проследить на простейших по сравнению с белком, но в принципе аналогичных примерах укладку цепей в нативные структуры. Перечисленные молекулы позволяют также рассмотреть актуальный для белков вопрос о роли дисульфидных мостиков в пространственной организации пептидов, о побудительных мотивах и механизме их образования. Конформационный анализ бициклических апамина, тертиапина и MCD-пептида и полициклического инсектотоксина I₁ выполнен для линейных последовательностей без учета S-S-связей.

В соответствии с термодинамической гипотезой Анфинсена и теорией структурной организации белка (см. гл. 2), будем считать, что механизм свертывания этих сложных олигопептидов является не статистическим, а статистико-детерминистическим, причем стерически возможными или предпочтительными становятся взаимодействия только между определенными парами остатков Cys. Расчет всех молекул строился таким образом, что его результаты должны были опровергнуть или доказать справедливость представления о том, что определяет конформацию молекулы не образование дисульфидных мостиков, а, напротив, детерминированные состояния различных участков цепи, взаимодействия между которыми диктуют избирательную сближенность цистеиновых пар. При априорном многостадийном конформационном анализе пептидов из 18, 21, 22 и 36 аминокислотных остатков случайная сближенность цистеинов практически исключена. Поэтому автоматический приход на завершающей стадии расчета каждого пептида к самым низкоэнергетическим конформациям линейной последовательности молекулы с близкими контактами между соответствующими остатками Cys будет одновременно свидетельствовать о наличии согласованности всех видов межостаточных взаимодействий в глобальной структуре (одно из основных положений конформационной теории белка), справедливости термодинамической гипотезы образования дисульфидных связей, адекватности использованных в расчете потенциальных функций реальным атом-атомным взаимодействиям и, наконец, о правильном решении всех конкретных структурных задач.

10.2. АПАМИН

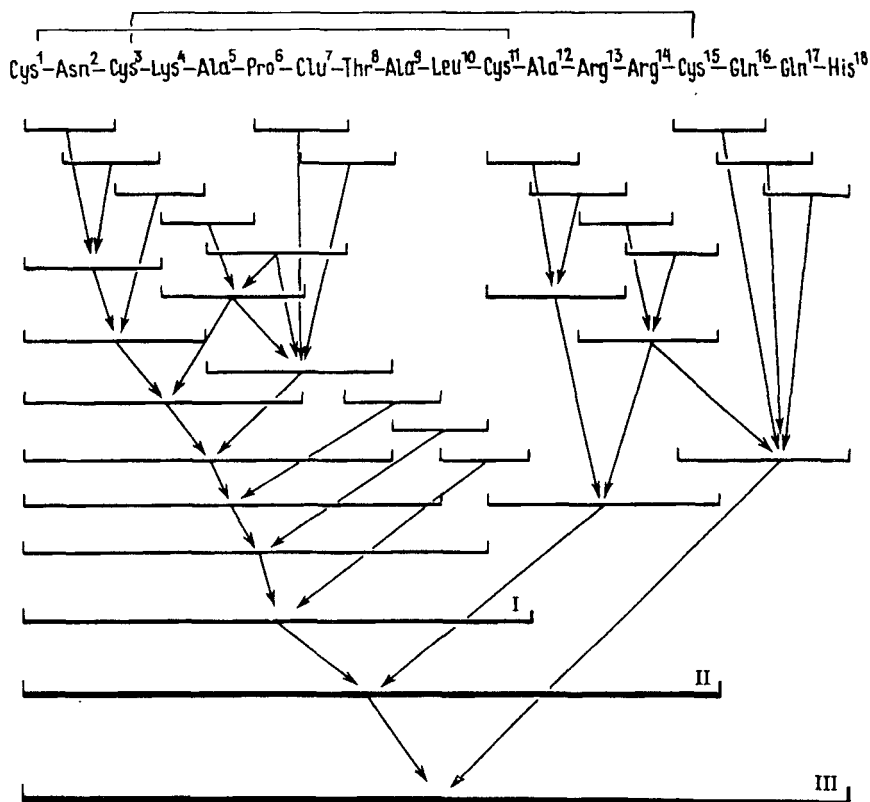
Апамин, оказывающий сильное токсическое действие на центральную нервную систему, был впервые выделен в 1965 г. Е. Хэберманном и К. Рейцем из яда пчелы [74, 75]. Его химическое строение установлено Р. Чиполини и соавт. [76]. Оказалось, что молекула апамина представляет собой октадекапептид, включающий четыре остатка цистеина, которые образуют два дисульфидных мостика Cys¹-Cys¹¹ и Cys³-Cys¹⁵ (рис. III.10). Спонтанное реокисление полностью восстановленного пептида при pH 8,5 и температуре 25°C происходит достаточно быстро (хотя и не с 100%-ным выходом) и приводит к полной реставрации его нативной конформации



Р и с. III.10. Аминокислотная последовательность апамина

Первые исследования зависимости между структурой апамина и его функцией проведены Дж. Винсентом и соавт. [77] и К. Гранье и соавт. [78]. Изучение различных физико-химических свойств апамина указывает на то, что молекула имеет жесткую бициклическую структуру [79–83]. Она сохраняется практически неизменной в широкой области значений pH, мало подвержена влиянию природы растворителя и химической модификации боковых цепей ряда функциональных остатков [79]. В работах К. Гранье и соавт. [78] и А.И. Мирошникова и соавт. [79] показано, что для проявления нейротоксичности апамина критическими являются два остатка (Arg¹³ и Arg¹⁴). Синтетический апамин по своей биологической активности, структуре и другим свойствам, как и следовало ожидать, полностью идентичен природному [84].

Теоретический конформационный анализ *ab initio* апамина, проведенный П.Н. Мельниковым и автором данной монографии [85–89], был разбит на четыре этапа, в каждом из которых использовались результаты предшествующего. В свою очередь, этапы делились на целый ряд последовательно решаемых стадий (рис. III.11). Первый этап включает рассмотрение конформационных возможностей ундекапептидного участка Cys¹–Cys¹¹, чему предшествовало решение конформационных задач для ди-, три-, тетра- и т.д. пептидных фрагментов. Полученные здесь результаты и независимое исследование пентапептидного участка Cys¹¹–Cys¹⁵ послужили на завершающей стадии второго этапа основой для конформационного анализа пентадекапептидного фрагмента апамина Cys¹–Cys¹⁵. Третий этап состоял из расчета С-концевого тетрапептида Cys¹⁵–His¹⁸ сначала в его свободном состоянии, а затем во взаимодействии с конфор-



Р и с. III.11. Схема конформационного анализа молекулы апамина

мациями пентадекапептидного участка Cys¹-Cys¹⁵, полученными на втором этапе. Наконец, четвертый этап заключался в уточнении структуры апамина путем повторного рассмотрения конформационных состояний боковых цепей остатков в потенциальном поле всей молекулы. Кратко остановимся на наиболее интересных моментах каждого этапа. В табл. III.11 представлены величины относительной энергии $U_{\text{общ}}$ предпочтительных конформаций ундекапептидного участка Cys¹-Cys¹¹, полученные на основе детального рассмотрения пространственного строения большого числа составляющих его фрагментов (рис. III.11). Глобальная структура ($U_{\text{общ}} = 0$) четко делится на два различных по своим конформационным свойствам участка: Cys¹-Thr⁸ и Ala⁹-Cys¹¹. Первый образует в значительной степени автономную от остальной части фрагмента Cys¹-Cys¹¹ конформационно жесткую нуклеацию, которая стабилизирована эффективными взаимодействиями между входящими в нее остатками. Рассмотрев возможное пространственное строение линейного ундекапептидного фрагмента апамина, авторы работ [76-80] подошли к наиболее интересному этапу исследования – оценке стерической предрасположенности рассчитанных конформаций к образованию дисульфидной связи. В

Относительная энергия линейных и циклических конформаций
фрагмента Cys¹–Cys¹¹ апамина

Шейп	Конформация	$U_{\text{общ}}$, ккал/моль
<i>Линейный ундекапептид</i>		
	$R_2^1 - B_{23}^2 - R_3^3 - R_{2222}^4 - B^5 - R^6 - B_{311}^7 - B_{31}^8 - R^9 - B_{32}^{10} - B_3^{11*}$	0
<i>feffefeefe</i>	$R_2 - B_{23} - R_2 - R_{2222} - B - R - B_{311} - B_{31} - B - L_{32} - B_3^*$	2,0
	$R_2 - B_{23} - R_3 - R_{2222} - B - R - B_{311} - B_{31} - R - R_{32} - L_3^*$	3,6
<i>feffefeefe</i>	$R_2 - B_{23} - R_2 - R_{2222} - B - R - B_{311} - B_{31} - L - R_{32} - B_2$	2,0
<i>ffffefeefe</i>	$R_3 - R_{13} - R_3 - R_{2222} - B - R - R_{311} - B_{11} - R - B_{32} - B_2$	0,5
<i>ffffefeefe</i>	$R_1 - R_{13} - R_3 - R_{2222} - B - R - R_{311} - B_{11} - B - B_{32} - B_3^*$	3,3
<i>eeefeefeefe</i>	$B_3 - B_{13} - B_2 - R_{3222} - B - R - R_{311} - B_{22} - B - B_{32} - B_2^*$	7,4
<i>Циклический ундекапептид</i>		
	$R_{22} - B_{23} - R_3 - R_{2222} - B - R - B_{311} - B_{31} - R - B_{32} - B_{12}$	0
<i>feffefeefe</i>	$R_{22} - B_{23} - R_2 - R_{2222} - B - R - B_{311} - B_{31} - B - L_{32} - B_{31}$	5,5
	$R_{22} - B_{23} - R_2 - R_{2222} - B - R - B_{311} - B_{31} - R - R_{32} - L_{33}$	7,4
<i>ffffefeefe</i>	$R_{12} - R_{13} - R_3 - R_{2222} - B - R - R_{311} - B_{11} - B - B_{32} - B_{32}$	11,0
<i>eeefeefeefe</i>	$B_{33} - B_{13} - B_2 - R_{3222} - B - R - R_{311} - B_{22} - B - B_{32} - B_{21}$	17,3

Примечание. Звездочками отмечены конформации со сближенными остатками Cys¹ и Cys¹¹.

молекуле апамина, содержащей остатки цистеина в 1, 3, 11 и 15-м положениях, возможны три системы дисульфидных связей: 1–3, 11–15; 1–11, 3–15 и 1–15, 3–11. В процессе многоступенчатого подхода к выяснению конформационных состояний фрагмента Cys¹–Cys¹¹ не было сделано ни одного предположения о реализации той или иной системы. Образование дисульфидных связей 1–3 и 11–15 исключается, поскольку замыкание боковых цепей в первой цистеиновой паре встречает серьезные стерические затруднения. Полученные данные указывают и на малую вероятность замыкания связей 1–15 и 3–11. Во всех найденных структурах ундекапептидного фрагмента остатки Cys³ и Cys¹¹ далеки друг от друга и их принудительное сближение вызывает резкое повышение энергии. Результаты априорного конформационного расчета однозначно свидетельствуют в пользу только одной системы дисульфидных связей: 1–11 и 3–15. Расчет показал, что остатки Cys¹ и Cys¹¹ оказываются сближенными в пяти из семи предпочтительных конформаций, отмеченных в табл. III 11 звездочками. В этих конформациях линейного ундекапептида имеется хотя и слабое ($\pm 0,1$ ккал/моль), но в данном случае весьма показательное взаимодействие между остатками Cys¹ и Cys¹¹, которое указывает на малое расстояние между ними (3–4 Å). Полученные после минимизации при вариации всех двугранных углов ϕ , ψ и χ и замыкания цикла величины относительной энергии у пяти циклических вариантов ундекапептида Cys¹–Cys¹¹ приведены в этой же таблице. Образование связи S–S приводит к резкой энергетической дифференциации конформаций. Замыкание цикла в глобальной структуре дает самую предпочтительную конформацию циклического ундекапептида, абсолютная энергия невалентных взаимодействий которой практически совпадает с энергией соответствующей линейной конформации. Глобальная и следующая за ней низкоэнергетическая конформация циклического ундекапептида имеют одинаковый вид пептидного скелета и близкие формы основной цепи. Следовательно, циклические конформации *feffefeefe* не только намного предпочтительнее конформаций других видов по энергии, но и обладают большей энтропией.

Сопоставление энергии межостаточных взаимодействий и геометрических параметров линейной и циклической глобальной конформации показывает, что образование дисульфидного мостика не нарушает стабилизирующих контактов линейной конформации. Замыкание цикла приводит лишь к незначительному ослаблению монопептидных взаимодействий у остатков Cys¹ и Thr⁸ (на $\sim 1,0$ ккал/моль) и взаимодействия Thr⁸ с Leu¹⁰ (на 0,6 ккал/моль). Во всех остальных случаях энергия межостаточных взаимодействий с точностью до 0,1 ккал/моль оставалась неизменной. Заметные отклонения двугранных углов ϕ , ψ и χ от их значений в линейной глобальной конформации ундекапептида Cys¹–Cys¹¹ в процессе минимизации энергии при наложении стягивающего потенциала (см. ниже) между атомами S коснулись только остатков лабильной части Ala⁹–Leu¹⁰–Cys¹¹. Таким образом, замыкание цикла практически не затрагивает конформационных состояний остатков, входящих в нуклеацию Cys¹–Thr⁸. Все изменения двугранных углов произошли в пределах низкоэнергетических областей и не вызвали существенного нарушения благоприятных контактов. Аналогичная ситуация наблюдается и у другой конформации типа

feffefeefe ($U_{\text{общ}} = 5,5$ ккал/моль), относительная высокая энергия которой обусловлена *транс*-конфигурацией дисульфидного мостика. В случае конформаций типа *ffffefeefe* ($U_{\text{общ}} = 11,0$ ккал/моль) и *eeefeefe* ($U_{\text{общ}} = 17,3$ ккал/моль) образование цикла сопровождается значительным искажением геометрии линейной структуры и повышением энергии. Следовательно, только структуры шейпа *feffefeefe* линейного фрагмента апамина Cys¹–Cys¹¹ оказались предрасположенными к созданию дисульфидного мостика между Cys¹ и Cys¹¹.

Формирование глобальной структуры началось с гексапептидного фрагмента Cys¹–Pro⁶, конформационное состояние которого уже имело минимальную энергию. При последовательном переходе от гекса- к окта-, нона- и декапептиду части глобальной структуры ундекапептида неизменно оказывались самыми предпочтительными по энергии, а шейпы основной цепи – наиболее представительными по числу низкоэнергетических вариантов. Достройка глобальной структуры, как позднее и замыкание цикла, происходили без значительных изменений геометрических и энергетических параметров сложившихся конформационных состояний на более коротких участках. Таким образом, результаты априорного конформационного анализа, полученные для фрагмента Cys¹–Cys¹¹ апамина, убедительно свидетельствуют о строго детерминированном механизме укладки пептидной цепи природного олигопептида в нативную конформацию со сближенными остатками цистеинов, образующими дисульфидную связь, а также о согласованности всех видов межостаточных взаимодействий.

Следующий этап конформационного анализа апамина заключался в исследовании пентадекапептидного фрагмента Cys¹–Cys¹⁵. Вначале были рассмотрены конформационные возможности пентапептидного участка Cys¹¹–Ala¹²–Arg¹³–Arg¹⁴–Cys¹⁵ в его свободном состоянии. На основе отмеченных двух предпочтительных конформаций циклического ундекапептида Cys¹–Cys¹¹ и низкоэнергетических вариантов Cys¹¹–Cys¹⁵ исследованы структуры моноциклического тридекапептида Cys¹–Cys¹¹–Ala¹²–Arg¹³, а затем – бициклического пентадекапептида Cys¹–Cys³–Cys¹¹–Cys¹⁵. Величины относительной энергии рассчитанных конформаций последнего даны в табл. III.12. Из 12 рассмотренных конформаций пентадекапептида с двумя дисульфидными связями семь обладают высокой энергией. Также маловероятны еще три варианта с $U_{\text{общ}} = 11,4; 16,0$ и $10,9$ ккал/моль. Замыкание циклов в этих конформациях приводит, во-первых, к значительной деформации соответствующих оптимальных структур свободного пентапептида Cys¹¹–Cys¹⁵, что ведет к напряжению конформации фрагмента, и, во-вторых, к возникновению между боковыми цепями остатков Arg¹³, Arg¹⁴ и ундекапептидным циклом неблагоприятных контактов, которые нельзя устранить, не вызвав новых осложнений. Из оставшихся двух структур следует отдать предпочтение глобальной, которая более выгодна не только по конформационной энергии, но и энергии электронных взаимодействий в дисульфидных мостиках. В этой структуре бициклического пентадекапептида геометрические параметры в обеих группах C^β–S–S–C^β практически совпадают (различия $< 0,1$ Å) с экспериментальными значениями, а оба дисульфидных мостика имеют низкоэнергетическую *гош*-конфигурацию. Сопоставим энергию монопептидных

Таблица III 12

Относительная энергия конформаций бициклического и пентадекапептидного фрагмента
 $\text{Cys}^1\text{--Cys}^3\text{--Cys}^{11}\text{--Cys}^{15}$ апамина

Шейп	Конформация	$U_{\text{общ}}$, ккал/моль
<i>efee</i>	$R_{22}^1 - B_{23}^2 - R_{31}^3 - R_{2222}^4 - B^5 - R^6 - B_{311}^7 - B_{31}^8 - R^9 - B_{32}^{10} - B_{12}^{11} - R^{12} - B_{2222}^{13} - B_{3222}^{14} - B_{22}^{15}$	0
<i>-efee</i>	" " $-B_{12} - B - L_{2222} - B_{3222} - B_{22}$	*
<i>-efef</i>	" " $-B_{31} - R - R_{2222} - L_{3222} - B_{22}$	11,4
<i>-efee</i>	" " $-B_{12} - R - B_{2222} - R_{3222} - L_{22}$	*
<i>-efef</i>	" " $-B_{12} - R - B_{2222} - R_{3222} - B_{22}$	16,0
<i>-efef</i>	" " $-B_{12} - R - B_{2222} - B_{3222} - L_{22}$	7,7
<i>feffefee</i> — <i>efef</i>	$R_{22}^1 - B_{23}^2 - R_{31}^3 - R_{2222}^4 - B^5 - R^6 - B_{311}^7 - B_{31}^8 - B^9 - L_{32}^{10} - B_{31}^{11} - R^{12} - B_{2222}^{13} - B_{3222}^{14} - B_{22}^{15}$	10,9
<i>-efee</i>	" " $-B_{31} - B - L_{2222} - B_{3222} - B_{22}$	*
<i>-efee</i>	" " $-B_{31} - R - R_{2222} - L_{3222} - B_{22}$	*
<i>-efee</i>	" " $-B_{31} - R - B_{2222} - R_{3222} - L_{44}$	*
<i>-efee</i>	" " $-B_{31} - R - B_{2222} - B_{3222} - B_{22}$	*
<i>efee</i>	" " $-B_{31} - R - B_{2222} - B_{3222} - L_{22}$	*

Примечание Звездочками отмечены конформации с энергией $U_{\text{общ}} > 20,0$ ккал/моль

и межостаточных взаимодействий и значения двугранных углов основных и боковых цепей пентадекапептида $\text{Cys}^1\text{--Cys}^3\text{--Cys}^{11}\text{--Cys}^{15}$ с ундекапептидом $\text{Cys}^1\text{--Cys}^{11}$, тридекапептидом $\text{Cys}^1\text{--Cys}^{11}\text{--Ala}^{12}\text{--Arg}^{13}$ и пентапептидом $\text{Cys}^{11}\text{--Cys}^{15}$. Сравнение энергетических и геометрических параметров соответствующих конформационных состояний этих фрагментов позволяет сделать следующие заключения.

1. Образование второй дисульфидной связи $\text{Cys}^3\text{--Cys}^{15}$ апамина не нарушает стабилизирующих контактов и геометрии остатков в первой циклической системе. В свободном цикле $\text{Cys}^1\text{--Cys}^{11}$, включенном в пентадекапептид $\text{Cys}^1\text{--Cys}^3\text{--Cys}^{11}\text{--Cys}^{15}$, энергия межостаточных взаимодействий и двугранные углы имеют те же значения, несмотря на то, что остатки второго цикла, прежде всего Arg^{13} и Arg^{14} , осуществляют с остатками первого стабилизирующие (с Glu^7 $-3,2$ ккал/моль) и дестабилизирующие взаимодействия (с Cys^1 и Cys^{11} $+5,6$ ккал/моль). Отсутствие заметных изменений в энергии и геометрии $\text{Cys}^1\text{--Cys}^{11}$ объясняется электростатической природой этих взаимодействий, обладающих малым градиентом.

2. Сближение остатков Cys^3 и Cys^{15} , как и в случае Cys^1 и Cys^{11} , происходит за счет невалентных взаимодействий при конформационном состоянии пентапептида $\text{Cys}^{11}\text{--Cys}^{15}$, которое является одним из самых предпочтительных по энергии и энтропии для свободного фрагмента. Все изменения геометрических параметров пентапептида $\text{Cys}^{11}\text{--Cys}^{15}$ при его встройке в цикл происходят в пределах одних и тех же низкоэнергетических областей потенциальной поверхности.

3. Спонтанное образование двух дисульфидных связей в апаминах осуществляется в принципе по одному механизму. В его основе лежат конформационные аспекты. Следующая из расчета детерминация процесса создания дисульфидных мостиков обусловлена предрасположенностью соответствующих участков молекулы к такому формообразованию, которое неизбежно приводит к сближенности определенных остатков цистеина и к необходимой для окислительной реакции взаимной ориентации их боковых цепей. Валентному связыванию цистеинов предшествует образование на одном конце фрагмента конформационно жесткой нуклеации, а на другом — коротком — лабильного участка.

При сложившейся нуклеации и предпочтительной конформации лабильного участка атомы S вступают во взаимодействие. У апамина нуклеацию в первом цикле составляет последовательность $\text{Cys}^1\text{--Thr}^8$, а подвижную часть — $\text{Ala}^9\text{--Cys}^{11}$. Во втором цикле структурно жестким участком является циклический ундекапептид $\text{Cys}^1\text{--Cys}^{11}$, а лабильным — тетрапептид $\text{Ala}^{12}\text{--Cys}^{15}$. Два резко различающихся по своим конформационным свойствам участка выполняют в создании дисульфидного мостика различные функции, в равной мере необходимые для того, чтобы этот процесс совершался быстро, спонтанно и безошибочно. Благодаря нуклеации процесс становится не статистическим, а детерминированным. Конформационно лабильный участок легко реализует и делает низкоэнергетическими все изменения геометрии пептидной цепи, которые неизбежны при сближении атомов S на валентное расстояние.

Непосредственное использование результатов анализа фрагментов $\text{Cys}^{11}\text{--Cys}^{15}$ и $\text{Cys}^{15}\text{--His}^{18}\text{--NH}_2$ для расчета конформаций всей молекулы

Таблица III 13

Относительная энергия конформаций апамина

Шейп	Конформация	$U_{\text{общ}}$, ккал/моль
feffefeeffefee — fee — fef — eff — eef — eee — efe — ffe — fff	— $B_{2223}^{13}-B_{3232}^{14}-R_{22}^{15}-B_{213}^{16}-R_{311}^{17}-L_{33}^{18}$ — $B_{2223}-B_{3232}-R_{22}-B_{213}-R_{311}-L_{33}$ — $B_{2322}-B_{3122}-R_{22}-B_{213}-B_{311}-B_{33}$ — $B_{2223}-B_{3122}-R_{22}-B_{213}-R_{311}-B_{33}$ — $B_{2322}-B_{3122}-B_{22}-R_{221}-R_{311}-R_{21}$ — $B_{2322}-B_{3122}-B_{22}-R_{221}-R_{311}-R_{31}$ — $B_{2223}-B_{3122}-B_{22}-B_{213}-R_{311}-B_{33}$ — $B_{2223}-B_{3122}-B_{22}-B_{213}-B_{311}-B_{33}$ — $B_{2322}-B_{3122}-B_{22}-R_{211}-B_{213}-B_{33}$ — $B_{3212}-B_{3122}-R_{22}-R_{211}-R_{211}-L_{33}$ — $B_{3222}-B_{3122}-R_{22}-R_{211}-R_{221}-B_{31}$	{ 0 0,1 4,4 0,3 2 2 5,9 3,1 3,5 3,7 5,2 2,4

Примечание Во всех структурах апамина участок Cys¹-Ala¹² имеет конформационное состояние $R_{22}^1-B_{23}^2-R_{31}^3-R_{2222}^4-B^5-R^6-B_{311}^7-B_{31}^8-R^9-B_{32}^{10}-B_{12}^{11}-R^{12}$

амина сопряжено с рассмотрением множества вариантов. Поэтому пред-варительно были оценены конформационные возможности С-концевого декапептидного участка $\text{Ala}^9\text{--His}^{18}\text{--NH}_2$. В исходных для минимизации приближениях структура $\text{Ala}^9\text{--Cys}^{15}$ отвечала состоянию этого участка в глобальной конформации $\text{Cys}^1\text{--Cys}^{15}$, а структура $\text{Cys}^{15}\text{--His}^{18}\text{--NH}_2$ – конформациям с энергией от 9 до 6,0 ккал/моль. Расчет декапептида привел к заметной энергетической дифференциации его конформаций, которая в основном отражает стерическое соответствие между низкоэнергетическими состояниями свободного тетрапептида $\text{Cys}^{15}\text{--His}^{18}\text{--NH}_2$ и принятой структурой $\text{Ala}^9\text{--Cys}^{15}$. В самой предпочтительной конформации $\text{Ala}^9\text{--His}^{18}\text{--NH}_2$ С-концевой тетрапептид находится в состоянии, которое является глобальным для свободного фрагмента. Низкоэнергетичен также ряд вариантов с конформациями $\text{Cys}^{15}\text{--His}^{18}\text{--NH}_2$ шейпа *fee*. Менее элементарными оказались все свернутые структуры концевого фрагмента (fff). Конформации декапептида $\text{Ala}^9\text{--His}^{18}\text{--NH}_2$, использованные в расчете структуры всей молекулы амина, представляют все шейки и, за редким исключением, все формы основной цепи фрагмента $\text{Ala}^9\text{--His}^{18}\text{--NH}_2$.

Величины энергии рассчитанных конформаций амина, полученные после минимизации по двугранным углам основной и боковой цепей всей молекулы, представлены в табл. III 13. Расчет показал, что положение боковой цепи Arg^{14} с $\chi_1, \chi_2 \sim -60^\circ$ и $\chi_3, \chi_4 \sim 180^\circ$ (3322) наиболее выгодно для декапептида $\text{Ala}^9\text{--His}^{18}\text{--NH}_2$ и неприемлемо для амина из-за наталкивания гуанидиновой группы на дисульфидный мостик $\text{Cys}^1\text{--Cys}^{11}$. Новые предпочтительные ориентации боковой цепи Arg^{14} имеют следующие значения двугранных углов: $\chi_1 \sim -60^\circ, \chi_2 \sim 60^\circ, \chi_3, \chi_4 \sim 180^\circ$ (3122), $\chi_1 \sim -60^\circ, \chi_2\text{--}\chi_4 \sim 180^\circ$ (3222) и $\chi_1, \chi_3 \sim -60^\circ, \chi_2, \chi_4 \sim 180^\circ$ (3232).

Результаты теоретического конформационного анализа указывают на возможность реализации у молекулы амина ряда структур. Они различаются между собой конформационными состояниями С-концевого фрагмента $\text{Cys}^{15}\text{--His}^{18}\text{--NH}_2$, которые отвечают некоторым из наиболее низкоэнергетических конформаций свободного тетрапептида. Во всех случаях структура бициклической части амина $\text{Cys}^1\text{--Cys}^3\text{--Cys}^{11}\text{--Cys}^{15}$ совпадает (за исключением боковой цепи Arg^{14}) с глобальной конформацией свободного пентадекапептида. Образование в единой структуре молекулы целого ряда контактов между фрагментами $\text{Cys}^3\text{--Cys}^{11}\text{--Cys}^{15}$ и $\text{Cys}^{15}\text{--His}^{18}\text{--NH}_2$, энергия которых у четырех лучших конформаций равна соответственно $-12,0, -8,0, -9,0, -11,0$ ккал/моль, не сопровождается их дестабилизацией. Величины суммарной энергии внутри- и межостаточных взаимодействий у конформаций свободного фрагмента $\text{Cys}^{15}\text{--His}^{18}\text{--NH}_2$ и у соответствующих состояний в предпочтительных конформациях всей молекулы практически совпадают. Это свидетельствует о том, что в найденных структурах амина имеет место согласованность между всеми видами взаимодействий.

Из-за отсутствия кристаллической структуры амина не представляется возможным сопоставить рассчитанную *ab initio* конформацию октадекапептида непосредственно с данными прямого эксперимента. В литературе описано лишь несколько пространственных моделей, построенных

Таблица III.14

Предложенные пространственные модели молекулы апамина

Аминокислотный остаток	Метод									
	ТКА (ab initio) [85–89]		КД [91]		ЯМР [72, 92]		ЯМР (2D) [81]		Модельное построение [90]	
	Шейп	Конформация	Шейп	Конформация	Шейп	Конформация	Шейп	Конформация	Шейп	Конформация
Cys ¹		R ₂₂		L ₁		H ₂		L ₂		L ₂
Asn ²	<i>f</i>	B ₂₃	<i>f</i>	H ₂₁	<i>e</i>	B ₂₃	<i>f</i>	B ₂₁	<i>e</i>	R ₂₃
Cys ³	<i>e</i>	R ₃₁	<i>e</i>	B ₁	<i>e</i>	R ₃	<i>e</i>	R ₃	<i>f</i>	R ₁
Lys ⁴	<i>f</i>	R ₂₂₂₂	<i>e</i>	B ₂₂₂₂	<i>f</i>	R ₂₂₂₂	<i>f</i>	R ₂₂₂₂	<i>f</i>	R ₂₂₂₂
Ala ⁵	<i>f</i>	B	<i>e</i>	R	<i>f</i>	B	<i>f</i>	B	<i>f</i>	R
Pro ⁶	<i>e</i>	R	<i>f</i>	R	<i>e</i>	R	<i>e</i>	R	<i>f</i>	B
Glu ⁷	<i>f</i>	B ₃₁₁	<i>f</i>	R ₃₁₁	<i>f</i>	R ₃₁₁	<i>f</i>	R ₃₁₁	<i>e</i>	B ₃₁₁
Thr ⁸	<i>e</i>	B ₃₁	<i>f</i>	H ₃₁	<i>f</i>	R ₃₁	<i>f</i>	B ₃₁	<i>e</i>	R ₃₁

Предложенные пространственные модели молекулы апамина

Аминокислот- ный остаток	Метод									
	ТКА (ab initio) [85–89]		КД [91]		ЯМР [72, 92]		ЯМР (2D) [81]		Модельное построение [90]	
	Шейп	Конформа- ция	Шейп	Конформа- ция	Шейп	Конформа- ция	Шейп	Конформа- ция	Шейп	Конформа- ция
Ala ⁹	<i>e</i>	R	<i>e</i>	R	<i>f</i>	R	<i>e</i>	R	<i>f</i>	R
Leu ¹⁰	<i>f</i>	B ₃₂	<i>f</i>	R ₃₂	<i>f</i>	R ₃₂	<i>f</i>	R ₃₂	<i>f</i>	R ₃₂
Cys ¹¹	<i>e</i>	B ₁₂	<i>f</i>	R ₃	<i>f</i>	R ₁	<i>f</i>	R ₂	<i>f</i>	R ₂
Ala ¹²	<i>e</i>	R	<i>f</i>	R	<i>f</i>	R	<i>f</i>	R	<i>f</i>	R
Arg ¹³	<i>f</i>	B ₂₂₂₃	<i>f</i>	R ₂₂₂₁	<i>f</i>	R ₂₂₂₃	<i>f</i>	R ₂₂₂₃	<i>f</i>	R ₂₂₂₃
Arg ¹⁴	<i>e</i>	B ₃₂₂₂	<i>f</i>	R ₃₂₂₂	<i>f</i>	R ₃₂₂₂	<i>f</i>	R ₃₂₂₂	<i>f</i>	R ₃₂₂₂
Cys ¹⁵	<i>e</i>	R ₂₂	<i>f</i>	R ₃	<i>f</i>	R ₃	<i>f</i>	R ₂	<i>f</i>	R ₁
Gln ¹⁶	<i>f</i>	B ₂₁₃	<i>f</i>	R ₂₁₃	<i>f</i>	R ₂₁₃	<i>f</i>	R ₂₁₂	<i>f</i>	R ₂₁₃
Gln ¹⁷	<i>e</i>	R ₃₁₁	<i>f</i>	R ₃₁₁	<i>f</i>	R ₃₁₁	<i>f</i>	B ₃₁₁	<i>f</i>	R ₃₁₁
His ¹⁸	<i>e</i>	L ₃₃	<i>f</i>	B ₃₃	<i>e</i>	L ₁₃	<i>e</i>	B ₃₃	<i>f</i>	B ₃₃

на основе результатов исследования спектров ЯМР и КД молекулы. Поскольку наблюдаемые спектральные характеристики значительно уступают по количеству описывающим структуру переменным и, к тому же, далеко не всегда поддаются однозначной трактовке, то для построения структуры дополнительно привлекаются атомные модели, алгоритмы предсказания вторичных структур и всякого рода косвенные соображения. Очевидно, такой подход лишен предсказательной силы, а поэтому рассматриваемое ниже сопоставление рассчитанной априорно геометрии апамина с так называемыми экспериментально найденными структурами молекулы не может иметь контрольной функции и лишь преследует цель оценить последние с позиции предложенной автором и использованной в анализе пептида конформационной теории.

Известные "экспериментальные" структуры апамина и рассчитанная *ab initio* конформация молекулы, выраженные через идентификаторы и шейпы пептидного скелета, представлены в табл. III.14. Приведенные в таблице данные (за исключением первой колонки) отвечают значениям двугранных углов ϕ , ψ и χ , полученных К. Фриманом и соавт. [90] при минимизации энергии. Исходными приближениями служили структурные модели, предложенные в работах [72, 81, 91, 92]. За нулевые конформационные состояния боковых цепей, оставшиеся неопределенными в экспериментальных исследованиях, были приняты среднестатистические ориентации в белках, трехмерные структуры которых известны [93].

При конструировании пространственной модели апамина, как и тертиапина, МСД-пептида и секапина, Р. Хидер и У. Рагнарссон [91] использовали предсказательный алгоритм вторичных структур П. Чоу и Г. Фасмана [94] с параметрами М. Левитта [95]. После структурной идентификации локальных участков цепи рассчитывался спектр кругового дихроизма, добиваясь совпадения с наблюдаемым спектром путем коррекции содержания вторичных структур. Расчет выполнялся при значениях эллиптичности α -спирали и беспорядочного клубка, полученных Н. Гринфилдом и Г. Фасманом [96], и β -изгиба – С. Брахмачари и соавт. [97]. Окончательная структура состояла из неупорядоченного нонапептидного N-концевого участка и такой же длины α -спирального C-концевого участка. Модель апамина Хидера и Рагнарссона нельзя признать правдоподобной, поскольку она получена при многочисленных неконтролируемых или заведомо спорных допущениях. С определенностью можно сказать, что предложенная модель имеет высокую энергию, исключающую структурную самоорганизацию молекулы. Об этом свидетельствует хотя бы тот факт, что значения ϕ , ψ трех остатков (Asn^2 , Lys^4 , Ala^5) попадают на конформационную карту ϕ – ψ в области с энергией > 10 ккал/моль. Предсказательные возможности подходов к идентификации вторичных и супервторичных структур, подобных использованному в работе [91], подробно обсуждаются во втором томе настоящего издания [98. Гл. 8–10].

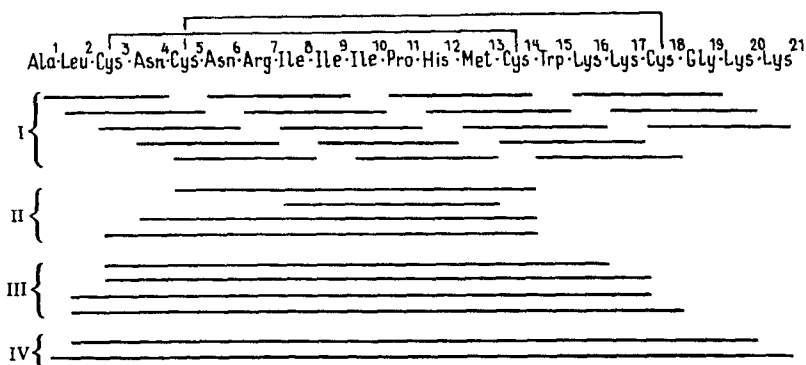
В.Ф. Быстров и соавт. [72, 92] построили свою модель апамина, отличную от модели Р. Хидера и У. Рагнарссона [91]. Они исходили главным образом из одномерных спектров протонного ЯМР и атомных моделей Дрейдинга. Благодаря сильному перекрытию сигналов авторам не удалось однозначно идентифицировать пики, принадлежащие остаткам Cys^3 и

Cys¹⁵, Arg¹³ и Arg¹⁴, Gln¹⁶ и Gln¹⁷. Для остальных звеньев цепи были определены двугранные углы ϕ , χ_1 (точнее, от одного до четырех значений для каждого из них) по эмпирическим карплюсовским зависимостям $^3J_{\text{NH-CH}} = f(\phi)$, установленным ранее [99]. В качестве вспомогательных данных использованы рН-зависимые химические сдвиги, а также спектры КД. На такой экспериментальной базе можно было построить множество моделей октадекапептида с двумя дисульфидными связями. Авторы [72, 92] ограничились лишь одной из этого множества, которая содержит β -изгиб (1–5) и α -спираль (6–17). Не внесло качественных изменений в предложенную В.Ф. Быстровым и соавт. [72, 92] модель апамина привлечение Д. Уэммером и Н. Колленбахом двумерного ЯМР [81]. Скорее наоборот, использование сочетания J-корреляционных спектров с ядерными спектрами Оверхаузера привело к структуре, в которой три остатка (Cys¹, Pro⁶, Glu⁷) находятся в напряженном состоянии, а их конформационные точки (ϕ , ψ) на карте ϕ – ψ попадают в область высокой энергии. В значительной мере случайна также модель апамина, предложенная в работе [90]. На какой основе она была сконструирована осталось неясно; сказано лишь, что значения двугранных углов были взяты из моделей Николсона.

Молекула апамина в силу ее конформационной жесткости может считаться почти идеальной моделью для изучения трехмерной структуры с помощью физико-химических и корреляционных методов и рассматриваться как критерий их информативных возможностей. Представленные выше результаты использования экспериментальных и эмпирических подходов (табл. III.14), по-видимому, позволяют заключить, что эти возможности в решении проблемы структурной организации относительно сложных пептидов все еще остаются весьма ограниченными. Любую из предложенных четырех моделей апамина, к построению которой были привлечены физико-химические методы и предсказательные алгоритмы, трудно отнести не только к строго доказанной, но и достаточно вероятной. Об их неадекватности реальной конформации апамина свидетельствуют высокая энергия взаимодействия валентно-несвязанных атомов и наличие между ними существенных различий, особенно касающихся N-концевой половины аминокислотной последовательности.

10.3. ТЕРТИАПИН

Тертиапин, как и апамин, – минорный компонент пчелиного яда. Этот пептид, состоящий из 21 аминокислотного остатка (рис. III.12), в том числе четырех остатков цистеина, образующих дисульфидные связи Cys³–Cys¹⁴ и Cys⁵–Cys¹⁸. Тертиапин действует главным образом на нервные клетки, изменяя скорость спонтанного высвобождения медиатора из пресинаптических окончаний, что, как полагают, обусловлено ингибированием активности регуляторного белка кальмодулина, с которым тертиапин специфически связывается. Результаты физико-химических исследований свидетельствуют о наличии у пептида компактной глобулярной структуры, стабильной в широком интервале значений рН, температуры и при изменении полярности растворителя. Важную роль в стабилизации пространственных



Р и с. III.12. Аминокислотная последовательность и схема конформационного анализа молекулы тертиапина

структур играет система из двух дисульфидных связей, восстановление которых приводит к денатурации молекулы.

Расчет пространственного строения тертиапина, выполненный А.Л. Ломизе и автором данной монографии [100], по времени следовал за расчетами апамина, брадикининпотенцирующих пептидов и ряда других объектов и учитывал накопленный опыт. Результаты предшествующих работ, в частности, показали, что большое значение в конформационном анализе сложных пептидов приобретает вопрос о рациональном способе разбиения последовательности на фрагменты, позволяющем максимально ускорить поиск пространственной структуры и получить наиболее надежные результаты. Главное, однако, заключалось не в совершенствовании методических приемов, а в получении достоверных результатов и апробации постулированных принципов. Используемый в анализе тертиапина и MCD-пептида способ разбиения последовательности на фрагменты не привел пока к быстрому решению задач, скорее наоборот. Его выбор был продиктован иными соображениями. Дело в том, что принятая в исследовании этих сложных пептидов процедура приближала к более глубокому пониманию механизма сборки природных последовательностей в нативные конформации. Авторы исходили из предположения, что метод расчета будет оптимальным в том случае, если он сможет моделировать реальный процесс самопроизвольного свертывания пептидной цепи в нативную конформацию. Для этого необходима была предварительная идентификация нуклеационных участков цепи, существование которых на коротких фрагментах (5–6 остатков) ранее было обнаружено в работах, рассмотренных выше. Рациональный способ поиска нуклеаций не известен, в связи с чем попытались выявить конформационно-жесткие участки, инициирующие укладку развернутой пептидной цепи, путем тотального изучения ближних и средних взаимодействий на всех перекрывающихся фрагментах (этап I, рис. III.12). Можно было надеяться, что процедура отбора низкоэнергетических конформаций даст наиболее надежные результаты, так как оптимальные по энергии конформации инициирующих участков могут служить своего рода "центрами кристаллизации" и входить в неизменном виде в

окончательную структуру молекулы. Все это были лишь предположения, но достаточно правдоподобные и настолько заманчивые, что нельзя было их не опробовать. За поиском компактно упакованных структур основной цепи, существенно выигрывающих по энергии на изолированных фрагментах, следовало рассмотрение взаимодействий нуклеаций друг с другом и с лабильными участками молекулы (этап II).

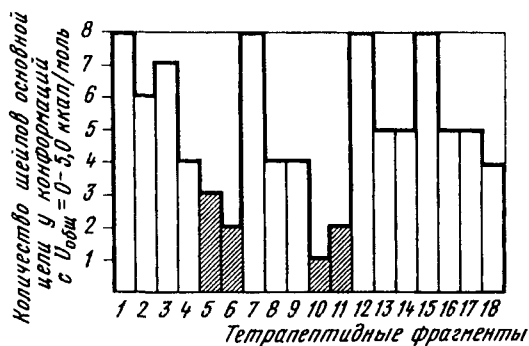
Для поиска нуклеаций были выбраны все перекрывающиеся по трем остаткам тетрапептидные фрагменты тертиапина. Тетрапептидный участок является оптимальным с двух точек зрения. При соответствующих упрощениях, о которых говорится ниже, анализ тетрапептида не требует предварительного рассмотрения его фрагментов, и в этом смысле он максимален из наиболее простых. В то же время у тетрапептида уже может обнаружиться тенденция к образованию структур, существенно выигрывающих по внутренней энергии. На более коротких участках не обнаруживаются решающие энергетические различия между формами основной цепи, не проявляется, например, ряд взаимодействий, существенных для стабилизации α -спирали и β -складчатого листа. При предварительном анализе тетрапептидных фрагментов для каждого остатка учитывалась только часть его возможных конформаций, выбор которых ограничивался следующим образом. Во-первых, не учитывались конформации всех аминокислотных остатков, кроме Gly, в области L; в R- и В-областях выбиралось по одной паре значений углов ϕ и ψ . Во-вторых, вначале перебор конформационных состояний боковых цепей проводился только по углу χ_1 , а значения других углов предполагались такими, которые чаще встречаются в белках (Lys, Arg — $\chi_2, \chi_3, \chi_4 \sim 180^\circ$; Ile — $\chi_2 \sim 180^\circ$; Trp — $\chi_2 \sim \pm 90^\circ$; Leu — $\chi_1, \chi_2 \sim 180, 60^\circ$ и $-60, 180^\circ$). Изменения углов χ_2, χ_3, χ_4 , как правило, влияют на энергию больших фрагментов, т.е. при участии боковых цепей Lys, Arg, Glu, Gln в дальних взаимодействиях остатков, удаленных по цепи, но сближенных в пространстве. На коротких фрагментах у этих остатков разные комбинации значений углов χ_2, χ_3, χ_4 обычно близки по энергии. В-третьих, для последнего остатка каждого фрагмента В-форма не рассматривалась, так как она отличается от R-формы лишь ориентацией концевой пептидной группы, которая мало сказывается на энергии фрагмента. Не учитывались также значения углов $\chi_1 \sim -60^\circ$ для первого остатка и $\chi_1 \sim 180^\circ$ для последнего, поскольку в соответствующих конформациях боковые цепи слабо взаимодействуют с фрагментом.

Изучение всех комбинаций выбранных таким образом конформаций аминокислотных остатков на тетрапептидных участках было начато с анализа фрагмента Ala²-Asn⁴ с последовательным перемещением по пептидной цепи с шагом в один остаток. Тетрапептидные фрагменты, на которых были обнаружены существенные энергетические различия между оптимальными конформациями разных типов, затем изучались более подробно. Для них проводился перебор всех возможных форм основной цепи, причем в пределах В-области выбирались 2–3 пары значений углов ϕ, ψ , а в R-области — 1–2, соответствующих положениям локальных минимумов энергии монопептидов. На тетрапептидных фрагментах количество рассмотренных локальных минимумов в пределах каждой формы основной цепи возрастало. Однако выбор значений ϕ и ψ на основе минимумов

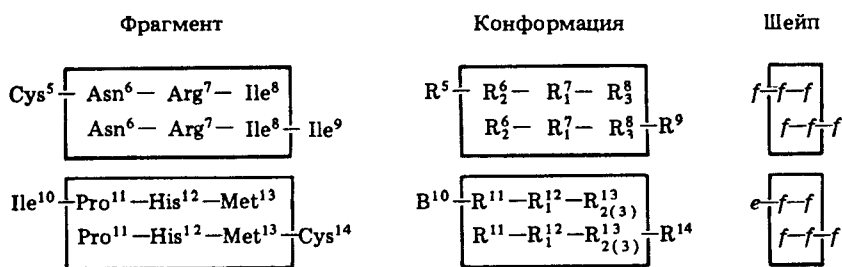
монопептидов, а также одновременный перебор конформаций по углу χ_1 позволяют обнаружить все низкоэнергетические структуры тетрапептидов. Такой анализ позволил исключить тетрапептиды $\text{Leu}^2\text{-Cys}^5$ и $\text{Trp}^{15}\text{-Cys}^{18}$, на которых первоначально были обнаружены резкие энергетические различия, из числа конформационно жестких фрагментов и выявить области пептидной цепи, где действительно формируются нуклеации, инициирующие сворачивание молекулы. После расчета фрагментов с нуклеациями проводилось постепенное наращивание пептидной цепи с отбором оптимальных конформаций лабильных участков. При этом в низкоэнергетических линейных структурах остатки цистеина автоматически оказывались сближенными, образуя дисульфидные связи без заметного изменения энергии и ограничивая тем самым конформационную подвижность молекулы. На промежуточных этапах расчета остатки Cys заменялись Ala. При наращивании пептидной цепи для добавляемых остатков первоначально проводился перебор конформаций с различными значениями углов χ_1 . В некоторых случаях после анализа атомных моделей у низкоэнергетических структур проверялись также все конформеры по углам $\chi_1\text{--}\chi_4$ тех боковых цепей, которые могли принять участие в новых взаимодействиях. При контакте между двумя боковыми цепями рассматривались все возможные комбинации значений углов $\chi_1\text{--}\chi_4$ обеих цепей. Эта процедура всегда проводилась при анализе возможности образования дисульфидных связей и изучении конформационной подвижности всей молекулы.

Учет ближних и средних взаимодействий у 18 рассмотренных тетрапептидов выявил следующую картину. У фрагментов $\text{Cys}^5\text{--Ile}^8$, $\text{Asn}^6\text{--Ile}^9$ и $\text{Ile}^{10}\text{--Met}^{13}$, $\text{Pro}^{11}\text{--Cys}^{14}$ (рис. III.13) обнаруживается тенденция к избирательной стабильности одного-трех родственных типов структур со свернутыми шейпами пептидного скелета (*fff*, *eff* и *ffe*). Оптимальные конформации отмеченных перекрывающихся тетрапептидов оказались идентичными по геометрии основной и боковых цепей на их общих участках (рис. III.14), что позволило сделать вывод о наличии у тертиапина двух нуклеаций: $\text{Cys}^5\text{--Ile}^9$ и $\text{Ile}^{10}\text{--Cys}^{14}$, каждая из которых состоит из пяти аминокислотных остатков, включенных в α -спираль. На остальных участках молекулы тертиапина нет выраженных энергетических предпочтений. Следовательно, эти участки являются конформационно-лабильными на начальном этапе сворачивания пептидной цепи.

Возможность образования первой дисульфидной связи изучалась на фрагменте $\text{Cys}^3\text{--Cys}^{14}$. Сначала рассматривались возможные линейные конформации, а затем добавлялись квадратичные потенциалы, стягивающие атомы S и C^β соответствующих остатков цистеина на расстояния, отвечающие равновесной геометрии дисульфидной связи (см. ниже). У тертиапина могут в принципе реализовываться три системы связей S-S: $\text{Cys}^3\text{--Cys}^5$ и $\text{Cys}^{14}\text{--Cys}^{18}$, $\text{Cys}^3\text{--Cys}^{18}$ и $\text{Cys}^5\text{--Cys}^{14}$, $\text{Cys}^3\text{--Cys}^{14}$ и $\text{Cys}^5\text{--Cys}^{18}$. Однако первая система нереальна, поскольку связь между остатками Cys, разделенными всего одним аминокислотным остатком, энергетически не выгодна и не встречается в белках. Остатки Cys^5 и Cys^{14} (вторая система) также не могут образовать дисульфидный мостик, так как они расположены по разные стороны α -спирального участ-



Р и с. III.13. Шейпы низкоэнергетических конформаций тетрапептидных фрагментов тертиапина



Р и с. III.14. Шейпы и конформации участков полипептидной цепи тертиапина, инициирующие сворачивание молекулы

ка $\text{Cys}^5\text{--Ile}^9$. В то же время связь $\text{Cys}^3\text{--Cys}^{14}$ формируется при самом незначительном изменении энергии невалентных взаимодействий (< 4 ккал/моль) в трех низкоэнергетических конформациях соответствующего фрагмента (табл. III.15). Таким образом, расчет позволил однозначно установить систему дисульфидных связей $\text{Cys}^3\text{--Cys}^{14}$, $\text{Cys}^5\text{--Cys}^{18}$, которая полностью соответствует химическому эксперименту.

На следующем этапе конформационного анализа тертиапина (см. рис. III.12) был проведен отбор оптимальных конформаций не на изолированных фрагментах лабильной области $\text{Cys}^{14}\text{--Lys}^{21}$, а на фрагментах, включающих участок $\text{Cys}^3\text{--Met}^{13}$ с уже определившейся геометрией основной цепи. Необходимость именно такого подхода обусловлена тем, что структуру области $\text{Cys}^{14}\text{--Lys}^{21}$, сформированную на заключительном этапе сворачивания, определяют в основном дальние взаимодействия с ранее образовавшимся спиральным участком $\text{Cys}^3\text{--Ile}^9$. Укладка первоначально лабильного участка $\text{Cys}^{14}\text{--Lys}^{17}$ на поверхности плотного "ядра" $\text{Cys}^3\text{--Cys}^{14}$ существенно ограничивает его конформационную подвижность: сокращается число низкоэнергетических конформаций основной и боковых цепей и уменьшается подвижность по углам ϕ и ψ . Относительную энергию до 6 ккал/моль имеют 9 из 54 возможных форм участка $\text{Cys}^{14}\text{--Lys}^{17}$, представленные в большинстве случаев лишь одной

Таблица III 15

Низкоэнергетические структуры основной цепи фрагмента Cys³-Cys¹⁴ тертиапина

Форма основной цепи	Относительная энергия фрагмента, ккал/моль		
	Линейного	Со сближенными C ^β -атомами цистеинов*	После образования дисульфидной связи
R ³ -R ⁴ -R ⁵ -R ⁶ -R ⁷ -R ⁸ -R ⁹ -B ¹⁰ -R ¹¹ -R ¹² -R ¹³ -B ¹⁴	0,0	0,0	0,0
R - R » » » R - L	1,1	2,9	3,6
R - B » » » R - R	1,0	6,5	-
R - B » » » R - L	2,5	8,0	-
B - B » » » R - R	2,0	9,8	-
B - B » » » R - L	3,5	9,7	-
B - R » » » R - B	1,4	3,0	2,9
B - R » » » R - L**	1,7	-	-

* Для структур со сближенными C^β-атомами цистеинов, характеризующихся относительной энергией 0–6 ккал/моль, изучались возможные конформации дисульфидной связи.

** При этой форме не удастся сблизить C^β-атомы цистеинов на расстояние < 5 Å, при котором возможно образование дисульфидной связи.

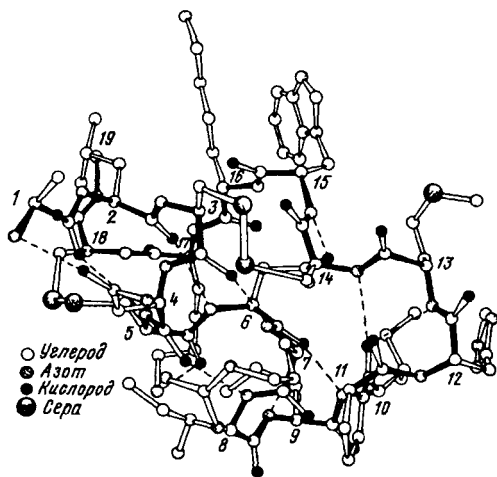
р и с. III.15. Трехмерная структура конформационно жесткого каркаса фрагмента Ala¹–Cys¹⁸ молекулы тертиапина

комбинацией значений χ_1 остатков Trp¹⁵, Lys¹⁶ и Lys¹⁷. Выбор единственного способа упаковки участка Cys¹⁴–Lys¹⁷ осуществляется только при формировании второй дисульфидной связи. В результате выяснено, что сближенность между остатками Cys⁵ и Cys¹⁸ имеет место лишь в оптимальной конформации линейного фрагмента Leu²–Cys¹⁸.

Стерические напряжения не возникают только при согласованном изменении углов χ_2 Ile⁹ и χ_3 Lys¹⁷. При этом улучшаются взаимодействия боковых цепей остатков Ile⁹ и Lys¹⁷ и образуется водородная связь ϵ -NH₃-группы Lys¹⁷ именно с той карбоксильной группой основной цепи, которая выпадает из системы водородных связей спирали Cys³–Ile⁹ при формировании первой дисульфидной связи. Наличие такой тонкой согласованности взаимодействий различных участков пептидной цепи, достигнутой благодаря их точному геометрическому соответствию, по-видимому, служит веским доводом в пользу реальности рассчитанной структуры тертиапина.

Следует подчеркнуть, что именно ван-дер-ваальсовы взаимодействия формируют структуры, в которых остатки Cys³ и Cys¹⁴, а также Cys⁵ и Cys¹⁸ оказываются сближенными на расстояние, необходимое для образования дисульфидных связей, расположение которых соответствует экспериментально полученной схеме. С другой стороны, только после образования этих связей избирательно стабилизируется единственная конформация основной цепи молекулы. Автоматическое сближение остатков цистеина при расчете плотноупакованных структур является хорошим контролем правильности найденной конформации, так как фиксация конформационных углов основной цепи допускает лишь незначительные (на 1,5–2 Å) изменения расстояний между C β -атомами цистеинов, необходимые для формирования дисульфидных связей. На заключительном этапе расчета (см. рис. III.12) уже для целой молекулы тертиапина рассматривались конформационные возможности боковых цепей и коротких N- и C-концевых участков, расположенных за пределами системы дисульфидных связей. Участок Gly¹⁹–Lys²⁰–Lys²¹ молекулы тертиапина лабилен в интервале 0–6 ккал/моль у него имеется восемь различных конформаций основной цепи, относящихся к четырем типам.

Бициклическая конформационно жесткая область молекулы состоит из двух α -спиральных фрагментов Ala¹–Ile¹⁰ и Ile¹⁰–Cys¹⁴ и короткого нерегулярного участка Cys¹⁴–Cys¹⁸ (рис. III.15). Здесь структура основной цепи



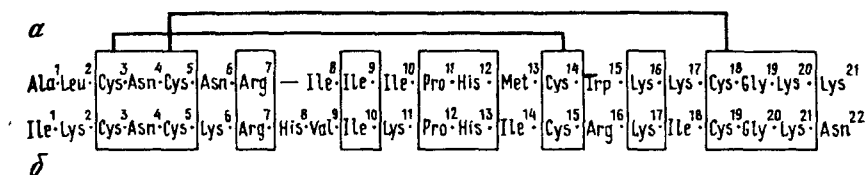
детерминирована однозначно и подвижность большинства боковых цепей существенно ограничена в результате их плотной упаковки: изменение углов χ_1 и χ_2 большинства остатков приводит к увеличению энергии на 4 ккал/моль и выше. Наиболее подвижны боковые цепи Asn⁴, Arg⁷ и Met¹³. Оптимальная конформация тертиапина имеет 12 внутримолекулярных водородных связей. Восемь из них образованы пептидными группами на спиральных участках Leu²–Ile⁹ (Ala¹CO...HNCys⁵, Leu²CO...HNAsn⁶, Cys³CO...HNIle⁸, Asn⁴CO...HNIle⁸, Asn⁶CO...HNIle⁹, Asn⁶CO...HNIle¹⁰) и Pro¹¹–Met¹³ (Ile¹⁰CO...HNMet¹³, Ile¹⁰CO...HNCys¹⁴). Четыре водородные связи образуются между основной и боковыми цепями остатков: Cys⁵CO...ε-NH₃Lys¹⁷, Trp¹⁵NH...OC(NH₂)Asn⁶, Ala¹+NH₃...OC(NH₂)Asn⁴, Lys²¹CO...ε-NH₃Lys¹⁶. Последние две связи легко разрываются при изменении состояний боковой цепи остатка Asn⁴ и участка Gly¹⁹–Lys²⁰–Lys²¹. Равновесные расстояния r_0 и водородных связей Asn⁶CO...HNIle⁹ и Ile¹⁰CO...HNMet¹³, характерных для спирали 3₁₀, увеличены до 2,1 Å, а у остальных связей находятся в диапазоне 1,75–1,95 Å.

В найденной для молекулы тертиапина трехмерной структуре (размером ~13 × 19 × 20 Å) все заряженные группы расположены на поверхности компактной глобулы, удалены друг от друга и направлены в окружающую среду. Почти все группы C=O и N–H погружены в глобулу и образуют водородные связи. Все это результат априорного расчета. Конформация тертиапина не похожа на структуру рассмотренного ранее апамина, содержащего такую же систему дисульфидных связей, однако отличающегося по функции. Аминокислотные последовательности апамина и тертиапина имеют разное число остатков и совпадают между собой только на N-концевом участке (Cys–Asn–Cys).

10.4. MCD-ПЕПТИД

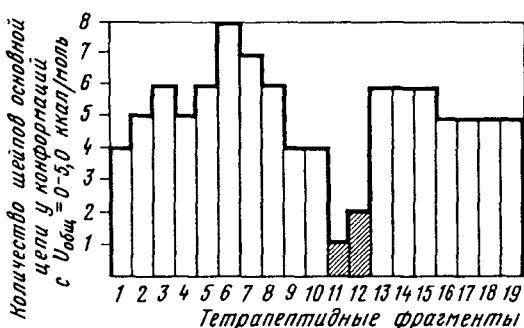
MCD (must cell degranulating)-пептид, как тертиапин и апамин, – минорный компонент пчелиного яда. Аминокислотные последовательности MCD-пептида и тертиапина обнаруживают признаки гомологии (рис. III.16), что, по-видимому, указывает на их эволюционное происхождение от общего предшественника. Различие в химическом строении двух пептидов привело к появлению и существенного функционального отличия. MCD-пептид действует на соединительную ткань. В низких концентрациях (10^{−9} мг/кг) он индуцирует выброс гистамина и серотина из тучных клеток (что отражено в его названии), а при более высоких дозах (10^{−3} мг/кг) обладает ярко выраженной противовоспалительной активностью (замедляет развитие опухолей, препятствует увеличению проницаемости кровеносных сосудов под действием различных воспалительных агентов и ингибирует синтез простагландина E₁, участвующего в развитии вторичной стадии воспалительного процесса).

Конформационный анализ MCD-пептида [101] строился по тому же плану, что и анализ тертиапина. Расчет включал четыре этапа. На первом этапе проводился поиск компактно упакованных структур (нуклеаций), образующихся на начальной стадии свертывания пептидной цепи.



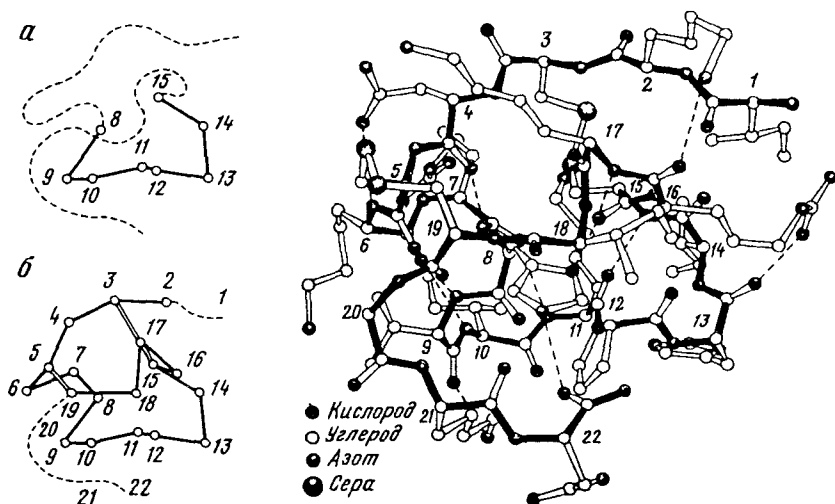
Р и с. III.16. Аминокислотные последовательности тертиапина (а) и MCD-пептида (б)

Выделены гомологичные участки и указана система дисульфидных связей



Р и с. III.17. Шейпы низкоэнергетических конформаций тетрапептидных фрагментов MCD-пептида

Участки, инициирующие сборку нативной конформации, были выявлены путем перебора конформаций 19 тетрапептидных фрагментов MCD-пептида. У перекрывающихся по трем остаткам тетрапептидов Lys¹¹-Ile¹⁴ и Pro¹²-Cys¹⁵ в интервал 0–5,0 ккал/моль попадают конформации лишь 1–2 шейпов, тогда как у остальных фрагментов – 4–8 шейпов (рис. III.17). Глобальные конформации Lys¹¹-Ile¹⁴ (B₁₃¹¹-R₁₂¹³-R₁¹⁴-R₃¹⁵ и Pro¹²-Cys¹⁵ (R₁₂¹²-R₁¹³-R₃¹⁴-R₁₅¹⁵) оказались идентичными на общем участке. Они предпочтительнее структурных вариантов других шейпов более чем на 5,0 ккал/моль, и поэтому можно полагать, что пептидная цепь токсина начинает сворачиваться на участке Lys¹¹-Cys¹⁵. Здесь формируется конформационно жесткая нуклеация, состоящая из α-спирального сегмента. Аналогичная нуклеация у тертиапина образуется на участке Ile¹⁰-Cys¹⁴ (рис. III.13). Структуры остальных участков MCD-пептида не детерминируются средними взаимодействиями, и, следовательно, на начальном этапе самоорганизации молекулы лабильны. Выбор конформационного состояния у них определяется взаимодействиями с более удаленными по цепи остатками. В связи с этим дальнейший поиск структуры MCD-пептида осуществлен путем постепенного наращивания пептидной цепи, начиная с участка Lys¹¹-Cys¹⁵, с энергетической оценкой возможных конформационных состояний фрагментов постепенно увеличивающейся длины. Цепь удлинялась, приближаясь к N-концу через фрагменты Lys¹¹-Ile¹⁴ → Val⁹-Ile¹⁴ → His⁸-Ile¹⁴ → Arg⁷-Ile¹⁴ → Arg⁷-Cys¹⁵ → Lys⁶-Cys¹⁵ → Cys³-Cys¹⁵. Отбор структур производился в интервале 0–0,6 ккал/моль



Р и с. III.18. Предполагаемый путь свертывания пептидной цепи молекулы MCD-пептида

а – формирование и упаковка нуклеаций; б – укладка первоначально лабильных участков с одновременным образованием двух дисульфидных связей. Сплошная линия – участки молекул с однозначно детерминированной геометрией основной цепи, пунктирная – лабильные участки, цифрами указаны номера атомов C^α

Р и с. III.19. Трехмерная структура молекулы MCD-пептида

У перечисленных пептидных фрагментов исследовались все возможные конформеры по двугранным углам боковых цепей. Тщательная укладка боковых цепей оказалась необходимой, поскольку в ряде случаев изменение их геометрии, даже небольшое, понижало энергию на 6–7 ккал/моль. В результате анализа у фрагмента Cys^3-Cys^{15} выявлена тенденция к стабилизации α -спирали в области Cys^3-Ile^{10} . У ближайших к нуклеации остатков His^8 , Val^9 и Ile^{10} однозначно определялась R-форма. На участке Cys^3-Arg^7 единственная структура основной цепи детерминруется благодаря формированию первой дисульфидной связи и невалентным взаимодействиям C- и N-концевых участков. Образование дисульфидной связи между остатками Cys^5 и Cys^{15} сопровождалось повышением энергии на 7 ккал/моль и более. В то же время другая пара цистеинов (Cys^3 и Cys^{15}) могла сформировать дисульфидную связь в низкоэнергетических конформациях фрагмента Cys^3-Cys^{15} при самом незначительном изменении энергии невалентных взаимодействий (< 1 ккал/моль). Эта связь, вошедшая в окончательную структуру MCD-пептида, образовывается только при трех формах основной цепи с относительной энергией 1,2; 2,6 и 3,3 ккал/моль (см. выше), которые и учитывали в дальнейшем расчете.

Таким образом, у MCD-пептида образование первой дисульфидной связи существенно ограничивает набор конформаций, но не определяет структуру участка Cys^3-Arg^7 однозначно. Только дальние взаимодействия остатков Arg^{16} , Lys^{17} и Ile^{18} с участком Cys^3-His^8 стабилизируют единственную форму $R^3-B^4-R^5-R^6-R^7-R^8-R^9-R^{10}-R^{11}-R^{12}-R^{13}-R^{14}-B^{15}$

На фрагменте Cys³-Ile¹⁸ эта форма выигрывает у двух других циклических структур свыше 6 ккал/моль. Ее С-концевой участок расположен перед α-спиралью Asn⁴-Lys¹¹ (рис. III.18), что обеспечивает сближенность остатков Cys⁵ и Cys¹⁹, образующих вторую дисульфидную связь. У фрагмента Cys³-Cys¹⁹ в интервале значений энергии 0–6 ккал/моль имеется набор конформаций, различающихся формой основной цепи на участке Arg¹⁶-Cys¹⁹. Только одна из этих конформаций обеспечивает образование дисульфидной связи Cys⁵-Cys¹⁹. При сближении атомов S и S^β соответствующих цистеинов ее энергия практически не меняется. В то же время циклизация всех остальных структур приводит к увеличению энергии на 6,0 ккал/моль и более. Дальние взаимодействия участка Cys¹⁵-Ile¹⁸ с остатком Lys², в свою очередь, окончательно определяют значения углов φ, ψ и χ последнего.

Расчетная структура MCD-пептида состоит из двух фрагментов α-спирали: Cys⁵-Lys¹¹ и Lys¹¹-Cys¹⁵, компактно упакованных N- и С-концевых участков нерегулярного строения, а также двух лабильных участков Ile¹ и Cys²⁰-Lys²¹-Asn²² (рис. III.19). Плотная упаковка MCD-пептида обусловлена эффективными невалентными взаимодействиями среднего и дальнего порядка, а также следующей системой водородных связей, равновесные расстояния (O...H) которых находятся в интервале 1,75–1,95 Å.

Основная цепь		Основная цепь	Боковая цепь		Боковая цепь
Asn ⁴ C=O	...	H-N His ⁸	Lys ² N ^ε -H	...	O=C Arg ¹⁶
Cys ⁵ C=O	..	H-N Val ⁹	Asn ⁴ C ^γ =O	...	H-N Lys ⁶
Lys ⁶ C=O	...	H-N Ile ¹⁰	Asn ⁴ C ^γ =O	...	H-N Cys ⁵
Arg ⁷ C=O	...	H-N Lys ¹¹	His ⁸ N ^δ -H	...	O=C Cys ¹⁵
Lys ¹¹ C=O	...	H-N Cys ¹⁵	His ⁸ N ^δ -H	..	O=C Cys ¹⁹
Cys ¹⁵ C=O	...	H-N Lys ¹⁷	His ⁸ N ^δ -H	..	O=C Asn ²²
			Arg ¹⁶ N ^η -H	...	O=C His ¹³
			Lys ²¹ N ^ε -H	...	O=C Val ⁹

Шесть водородных связей из 12, образованных боковыми цепями остатков Lys², Asn⁴, His⁸, Arg¹⁶ и Lys²¹, могут разрываться при изменении конформации этих боковых цепей.

В результате расчета получена единственная структура MCD-пептида, у которой значения двугранных углов φ, ψ и χ₁ на участке Lys²-Ile¹⁸ фиксированы. Изменение этих углов приводит к повышению конформационной энергии и почти всегда сопровождается существенными наталкиваниями атомов. Значения углов χ₂ однозначно определяются только у шести остатков: Cys³, Cys⁵, Arg⁷, Lys¹¹, Cys¹⁵ и Lys¹⁷. Для остальных углов χ₂-χ₄ боковых цепей молекулы возможны несколько конформаций с относительной энергией 0–3 ккал/моль. Таким образом, боковые цепи у MCD-пептида более подвижны, чем у тертиапина, где однозначно определялись значения 12 углов χ₂ и даже двух пар углов χ₃ и χ₄. Концевые участки MCD-пептида оставались лабильными, поскольку у них имелся набор низкоэнергетических конформаций основной и боковых цепей, различающихся значениями углов φ, ψ и χ₁-χ₄. У остатка Cys¹⁹, находящегося на границе конформационно жесткого и лабильного участ-

ков, однозначно определялась величина угла ϕ , однако угол ψ мог принимать два значения, отвечающих R- и V-формам остатка. Кроме того, возможны две близкие по энергии конформации дисульфидной связи Cys⁵–Cys¹⁹ с разными значениями угла χ_1 . Почти половина остатков MCD-пептида содержит положительно заряженные группы. Их энергию гидратации при расчете не учитывали. Полученная нами структура была оптимальна прежде всего по энергии ван-дер-ваальсовых взаимодействий, т.е. обладала наиболее плотной упаковкой атомов. Тем не менее все заряженные группы автоматически оказались на поверхности и контактировали с растворителем. При этом заряженные боковые цепи участвовали и в эффективных дисперсионных взаимодействиях внутри глобулы.

Полученная структура MCD-пептида согласовывалась с имеющимися экспериментальными данными. В низкоэнергетических линейных конформациях фрагментов Cys³–Cys¹⁵ и Lys²–Cys¹⁹ определенные остатки цистеина сближались и располагались в пространстве таким образом, что образование нативной системы дисульфидных связей не сопровождалось увеличением энергии. Расчетная структура MCD-пептида имела только шесть прочных водородных связей с участием NH-групп основной цепи, поскольку связи с боковой цепью Asn⁴ легко разрывались при изменении ее конформации. Это соответствовало данным ЯМР-спектроскопии о наличии шести медленно обменивающихся с растворителем протонов пептидных групп. Конформационная стабильность полученной структуры MCD-пептида и высокое содержание в ней α -спиральных участков согласовывалось с данными спектров кругового дихроизма.

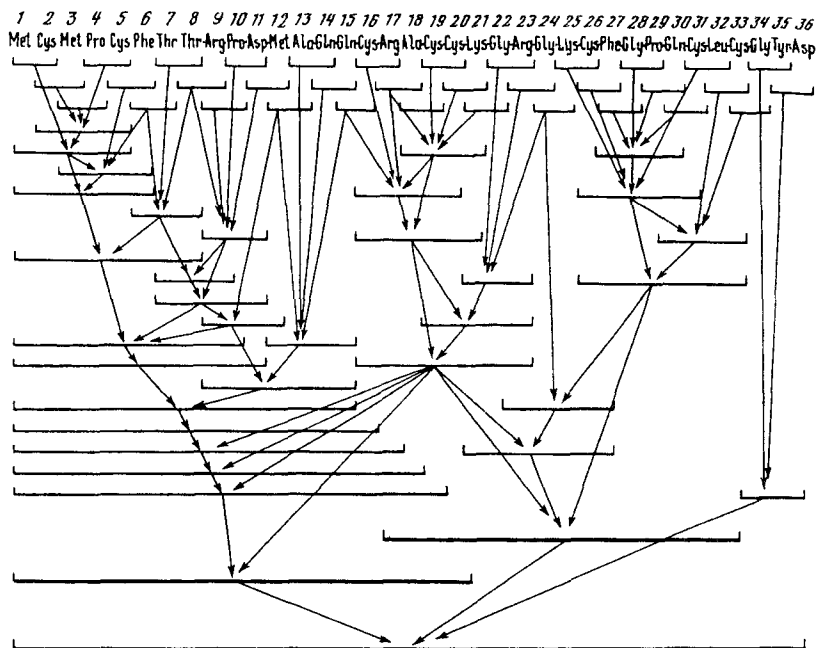
Расчитанные независимо трехмерные структуры гомологичных олигопептидов тертиапина и MCD-пептида имели ряд сходных черт. Гомологичные области Cys⁵–Ile¹⁴ (включая атомы C α Asn⁴ и Cys¹⁵) MCD-пептида и Asn⁴–Met¹³ тертиапина идентичны по геометрии основной цепи. Здесь находятся два фрагмента α -спирали, относительное расположение которых жестко фиксировано в результате их плотной упаковки друг с другом. Даже боковые цепи остатков His⁸–Ile¹⁴ MCD-пептида и Arg⁷–Met¹³ тертиапина ориентированы одинаково, поскольку у них близки значения углов χ_1 . В то же время C-концевые участки обеих молекул располагаются по разные стороны α -спиральной структуры, что в основном обусловлено различием в длине пептидной цепи внутри дисульфидного бицикла. Сворачивание пептидной цепи обеих молекул начинается с образования конформационно жесткой нуклеаиды, включающей один виток α -спирали Pro–His–Met(Ile)–Cys, на гомологичных участках Ile¹⁰–Cys¹⁴ тертиапина и Lys¹¹–Cys¹⁵ MCD-пептида. В результате образования нуклеаид первоначально лабильные участки молекул сближались в пространстве и начинали взаимодействовать между собой. При этом у них существенно уменьшался набор низкоэнергетических конформаций основной цепи. Единственная структура из этого набора конформаций, стабилизированных невалентными взаимодействиями, отбиралась после образования двух дисульфидных связей.

10.5. ИНСЕКТОТОКСИН I₁

Аминокислотная последовательность инсектотоксина I₁, выделенного из яда скорпиона, состоит из 26 остатков, в том числе 8 остатков цистеина [102]. Как и в случаях апамина, тертиапина и MCD-пептида, здесь также отсутствовали опытные данные о трехмерной в структуре пептида. Более того, была неизвестна реализующаяся в молекуле система четырех дисульфидных связей. Своеобразие конформационного анализа инсектотоксина [103] заключалось в том, что поиск его пространственной структуры выполнялся при неполной информации о ковалентной структуре. Согласно конформационной теории белка и термодинамической гипотезе Анфинсена, подтвержденных результатами расчета трех сложных олигопептидов (апамина, тертиапина и MCD-пептида), анализ линейной последовательности инсектотоксина должен был автоматически и в наиболее предпочтительных нециклических конформационных состояниях привести к сближению соответствующие остатки Cys и тем самым локализовать четыре цистеиновые пары. При многостадийном априорном расчете такого сложного пептида мала вероятность случайной идентификации единственной системы дисульфидных связей, удовлетворяющей всем положениям теории. Полная схема расчета пространственного строения инсектотоксина показана на рис. III.20. Первый шаг на пути к установлению трехмерной структуры молекулы заключался в рассмотрении конформационных возможностей коротких фрагментов, содержащих все восемь остатков цистеина: Met¹-Thr⁸, Cys¹⁶-Lys²¹ и Cys²⁶-Cys³³. На этом этапе конформационный анализ инсектотоксина должен был ответить на вопрос о предрасположенности выделенных фрагментов к образованию внутренних дисульфидных связей. Используя полученные здесь результаты, затем изучили более сложные участки молекулы Met¹-Cys²⁰ и Ala¹⁸-Cys³³ и, наконец, всю последовательность.

Исходными в анализе инсектотоксина служили наборы оптимальных конформаций свободных монопептидов, полученных из расчета соответствующих метиламидов N-ацетил- α -аминокислот. На их основе были рассчитаны конформационные состояния перекрывающихся дипептидных фрагментов. Низкоэнергетические варианты всех возможных форм основной цепи и шейпов дипептидов использованы в расчете более сложных участков молекулы. Ниже мы остановимся на некоторых узловых моментах конформационного анализа инсектотоксина. Завершающая стадия расчета октапептида Met¹-Thr⁸ заключалась в рассмотрении 130 исходных приближений 18 различных форм основной цепи. Минимизация выявила резкую дифференциацию конформаций по энергии; в широкий энергетический интервал $U_{\text{общ}} = 0-10$ ккал/моль попали лишь восемь родственных структурных вариантов. Во всех случаях боковые цепи остатков Cys² и Cys⁵ находятся далеко друг от друга и принудительное сближение атомов сопровождается значительным повышением энергии.

Исходные 354 структурных варианта гексапептида Cys¹⁶-Lys²¹ сформированы из конформационных состояний перекрывающихся по трем остаткам фрагментов Cys¹⁶-Cys²⁰ и Ala¹⁸-Lys²¹ с $U_{\text{общ}} \leq 6,0$ ккал/моль (см. рис. III.20). Они имели 76 форм основной цепи, распределяющихся по



Р и с. III 20 Схема конформационного анализа молекулы инсектотоксина I₁

всем в принципе возможным для гексапептида 32 шейпам. Минимизация энергии при варьировании двугранных углов ϕ , ψ и χ_1 свидетельствует об отсутствии очевидного преимущества какой-либо формы или шейпа пептидного скелета. Относительной энергией от 0 до 8,0 ккал/моль обладают 118 конформаций 36 форм основной цепи 20 различных типов. Сближенность атомов $S_{(16)}$ и $S_{(20)}$ наблюдается у конформаций следующих трех форм: $B^{16}-R^{17}-R^{18}-B^{19}-B^{20}$ (*effe*), $B^{16}-B^{17}-B^{18}-L^{19}-B^{20}$ (*efef*) и $B^{16}-B^{17}-B^{18}-L^{19}-B^{20}$ (*eeef*). Однако возможность образования дисульфидной связи $S_{(16)}-S_{(20)}$ здесь чрезвычайно мала. Все варианты первых двух форм имеют высокую энергию, а у представителей третьей формы создание S-S-связи неизбежно сталкивается с необходимостью изменения положения боковой цепи Arg^{17} , что ведет к резкому повышению энергии. Конформации последнего типа низкоэнергетичны только у линейной последовательности. Цикл с дисульфидной связью между Cys^{16} и Cys^{19} может быть создан на основе структуры с формами $B^{16}-B^{17}-L^{18}-B^{19}$ (*efe*) и $B^{16}-R^{17}-R^{18}-R^{19}$ (*eff*). Состояния шейпа *efe* имеют высокую энергию, а образование мостика в случае *eff* сопровождается нарушением стабилизирующих контактов и даже возникновением неблагоприятных взаимодействий. Поэтому мостик $S_{(16)}-S_{(19)}$ нереален, как и $S_{(15)}-S_{(29)}$. Невозможно образование дисульфидной связи и между смежными остатками Cys^{19} и Cys^{20} (см. ниже). На малую вероятность S-S-валентного связывания на участке инсектотоксина $Cys^{16}-Lys^{21}$ указывает также наличие незначительной энергетической дифференциации конформаций.

Иная ситуация имеет место у фрагмента Cys²⁶–Cys³³. Минимизация 100 исходных структур 64 шейпов пептидного скелета участка Cys²⁶–Cys³³ выявила их резкое различие в стабильности. В интервал 0–5,0 ккал/моль попадает всего пять конформаций, причем четыре из них, самые предпочтительные ($U_{\text{общ}} = 0\text{--}1,3$ ккал/моль), имеют идентичное конформационное состояние на участке Cys²⁶–Cys³¹, отвечающее глобальной структуре свободного гексапептида. В самых выгодных конформациях линейного октапептида Cys²⁶–Cys³³ участок Cys²⁶–Cys³¹ представляет собой жесткую нуклеацию, а Cys³¹–Cys³³ – лабильную часть. В нуклеации расстояние между атомами S боковых цепей Cys²⁶ и Cys³¹ составляет $\sim 3,6$ Å. Образование между ними валентной связи S–S, т.е. сближение до $2,04$ Å, сопровождается незначительным изменением геометрии, которое не приводит к нарушению стабилизирующих невалентных взаимодействий, сложившихся в оптимальной конформации линейной последовательности Cys²⁶–Cys³¹. В то же время создание S–S-связи между Cys²⁶ и Cys³³, как и между Cys³¹ и Cys³³, стерически невозможно. Таким образом, конформационный анализ фрагментов Met¹–Thr⁸, Cys¹⁶–Lys²¹ и Cys²⁶–Cys³³ сократил количество возможных у инсектотоксина систем дисульфидных связей со 105 до следующих шести (приведены номера остатков Cys) (см. рис. III.20):

I	2–16	5–19	20–33	26–31,
II	2–16	5–20	19–33	26–31,
III	2–19	5–16	20–33	26–31,
IV	2–20	5–16	19–33	26–31,
V	2–19	5–20	16–33	26–31,
VI	2–20	5–19	16–33	26–31.

Следующим этапом анализа инсектотоксина I₁ явилось рассмотрение конформационных состояний гексадекапептидного фрагмента Ala¹⁸–Cys³³ и оценка возможностей образования дисульфидной связи между Cys³³ и Cys¹⁹ или Cys²⁰. Ввиду сложности центрального участка Lys²¹–Lys²⁵ расчет этого фрагмента включал большое число стадий. На последней стадии было рассчитано более 100 конформационных состояний Ala¹⁸–Cys³³, представляющих собой комбинации низкоэнергетических вариантов Cys¹⁶–Lys²¹, Lys²¹–Phe²⁷ и Cys²⁶–Cys³³. В интервал 0–5,0 ккал/моль попало только три, а в интервал 0–10,0 ккал/моль – 18 конформаций. В четырех из них атом C^β остатка Cys³³ сближен за счет невалентных взаимодействий менее чем на 10 Å с атомом C^β остатка Cys¹⁹ или Cys²⁰ (согласно экспериментальным данным, это расстояние при наличии дисульфидной связи составляет $\sim 3,8$ Å при угле $\chi^{S-S} \pm 90^\circ$ и $4,8$ Å при $\chi^{S-S} 180^\circ$). Одна из этих конформаций имеет низкую энергию ($U_{\text{общ}} = 2,0$ ккал/моль), а три других – более высокую ($6,5\text{--}8,0$ ккал/моль). Все попытки образовать у них, как и у других конформаций с $U_{\text{общ}} \leq 10$ ккал/моль, дисульфидную связь между остатками Cys³³ и Cys¹⁹ оказались безуспешными. Сближение атомов S₍₃₃₎ и S₍₁₉₎ на валентное расстояние приводило к резкому увеличению энергии или вследствие рассогласованности ранее сложившихся стабилизирующих взаимодействий, или из-за возникновения неблагоприятных контактов.

Аналогичная ситуация имела место во всех случаях, кроме одного – при образовании дисульфидной связи между остатками Cys³³ и Cys¹⁹. Единственным исключением явилась конформация гексадекапептида с энергией $U_{\text{общ}} = 2,0$ ккал/моль. Ее циклизация приводит к такой бициклической структуре (S₍₂₀₎–S₍₃₃₎; S₍₂₅₎–S₍₃₁₎), абсолютная энергия которой (–103,5 ккал/моль) близка энергии исходной конформации (–105,2 ккал/моль). Из сравнения межостаточных взаимодействий и геометрии остатков в би- и моноциклической конформациях Ala¹⁸–Cys³³ следует, что, во-первых, образование второго S–S-мостика не нарушило стабилизирующих контактов предшествующей конформации и, во-вторых, отклонения двугранных углов основной цепи коснулись лишь С-концевого наиболее лабильного трипептидного участка Cys³¹–Cys³³. На этом участке локализуются и становятся низкоэнергетическими все изменения пептидной цепи, которые неизбежны при сближении атомов S на валентное расстояние. И, наконец, образование связи S₍₃₃₎–S₍₂₀₎, как и S₍₂₆₎–S₍₃₁₎, произошло по строго детерминированному механизму, в основе которого лежат конформационные аспекты.

Такой механизм обусловлен предрасположенностью фрагмента к формообразованию, автоматически приводящему к сближенности определенных остатков Cys. Результаты расчета фрагмента Ala¹⁸–Cys³³ уменьшили число возможных для молекулы инсектотоксина систем дисульфидных связей с шести до двух:

I	2–16	5–19	20–33	26–31,
III	2–19	5–16	20–33	26–31.

В конформационном анализе фрагмента Met¹–Cys²⁰, однако, не принята во внимание возможность образования дисульфидной связи между остатками Cys²⁰ и Cys³³. Была рассмотрена только вероятность образования шести S–S-мостиков между остатками Cys², Cys⁵ и Cys¹⁶, Cys¹⁹, Cys²⁰. Остановимся сначала на результатах расчета фрагмента Met¹–Cys¹⁶, в пределах которого возможно образование смеси фрагментов с дисульфидными связями Cys²–Cys¹⁶ или Cys⁵–Cys¹⁶. Расчету этого участка инсектотоксина предшествовало детальное рассмотрение конформационных возможностей ряда фрагментов меньшей длины (см. рис. III.20). Кроме отмеченного октапептида Met¹–Thr⁸ были рассчитаны Thr⁷–Pro¹⁰ (646), Thr⁷–Asp¹¹ (495), Arg⁹–Met¹² (1135), Met¹²–Gln¹⁵ (1051), Met¹–Pro¹⁰ (148) и Met¹–Asp¹¹ (48), Arg⁹–Gln¹⁵ (32) и Met¹–Gln¹⁵ (32) (в скобках указано количество рассмотренных вариантов данного фрагмента). По мере увеличения длины цепи от окта- до гексадекапептида неизменно возрастала энергетическая дифференциация конформаций и, как следствие, уменьшалось число подлежащих анализу структур. Фактически однозначная детерминация по форме и шейпу пептидного скелета, т.е. образование конформационно жесткой нуклеации, обнаруживается у декапептида Met¹–Pro¹⁰. Из 148 рассчитанных для фрагмента конформационных состояний в интервал 0–6,0 ккал/моль попадало только восемь вариантов, принадлежащих шейпу *efefefffe* и имеющих одну и ту же форму основной цепи. B¹–R²–B³–R⁴–B⁵–R⁶–R⁷–R⁸–B⁹–R¹⁰.

К расчету гексадекапептида Met¹–Cys¹⁶ остался набор из девяти ну-

евых приближений, которые различаются лишь состояниями С-концевого пептида $\text{Gln}^{15}\text{-Cys}^{16}$. Минимизация энергии выявила всего три предпочтительных линейных конформации шейпа *efefeffeffffff*. В самой низкоэнергетической из них актуальные для дисульфидной связи расстояния имели следующие значения (в Å): $\text{C}_{(2)}^{\beta} \dots \text{C}_{(16)}^{\beta} - 7,8$; $\text{S}_{(2)} \dots \text{S}_{(16)} - 3,4$ и $\text{C}_{(5)}^{\beta} \dots \text{C}_{(16)}^{\beta} - 7,0$; $\text{S}_{(5)} \dots \text{S}_{(16)} - 10,9$. Образовать дисульфидную связь удалось лишь между остатками Cys^2 и Cys^{16} . Все попытки сблизить остатки Cys^5 и Cys^{16} приводили к многочисленным наталкиваниям и расогласованности взаимодействий задолго до достижения расстояния между атомами $\text{S}_{(5)}$ и $\text{S}_{(16)}$, близкого длине валентной связи. В то же время образование связи $\text{S}_{(2)}\text{-S}_{(16)}$ не нарушило ни одного стабилизирующего контакта; величины энергии невалентных взаимодействий у глобальной конформации линейной последовательности $\text{Met}^1\text{-Cys}^{16}$ и соответствующей циклической структуры с дисульфидной связью $\text{S}_{(3)}\text{-S}_{(16)}$ практически совпадают. Найденная конформация фрагмента $\text{Met}^1\text{-Cys}^{16}$ имеет форму основной цепи: $\text{V}^1\text{-R}^2\text{-B}^3\text{-R}^4\text{-B}^5\text{-R}^6\text{-R}^7\text{-R}^8\text{-B}^9\text{-R}^{10}\text{-R}^{11}\text{-R}^{12}\text{-R}^{13}\text{-R}^{14}\text{-R}^{15}\text{-B}^{16}$ (*efefeffeffffff*), которая обеспечивает сближенность большинства остатков и реализацию между ними эффективных стабилизирующих взаимодействий. Вклады ближних, средних и дальних взаимодействий в общую конформационную энергию фрагмента ($-176,0$ ккал/моль) имеют стабилизирующий характер и составляют соответственно $-53,9$, $-102,6$ и $-19,6$ ккал/моль. Конформационные состояния всех остатков отвечают самым предпочтительным оптимальным конформациям свободных монопептидов. Наиболее эффективны в найденной конформации гексадекапептида средние взаимодействия, т.е. взаимодействия каждого остатка с четырьмя предшествующими и четырьмя последующими остатками по цепи. Форма основной цепи обеспечивает сближенность всех остатков и практически полную реализацию средних взаимодействий в пределах каждого перекрывающегося по восьми остаткам нонапептидного участка ($\text{Met}^1\text{-Arg}^9$, $\text{Cys}^2\text{-Pro}^{10}$, $\text{Met}^3\text{-Asp}^{11}$ и т.д.). Если не учитывать дисульфидную связь $\text{S}_{(2)}\text{-S}_{(16)}$, суммарный эффект дальних взаимодействий невелик; наиболее значительные стабилизирующие контакты образуют Met^3 с Arg^9 , Met^{12} , Ala^{13} и Phe^6 с Ala^{13} . В среднем на остаток энергия межостаточных взаимодействий составляет $-7,6$ ккал/моль ($-6,4$ и $-1,2$ ккал/моль соответственно за счет средних и дальних взаимодействий).

Конформационные возможности следующего крупного участка инсектотоксина $\text{Met}^1\text{-Cys}^{20}$ были исследованы путем поостаточной генерации фрагмента $\text{Met}^1\text{-Cys}^{16}$. Присоединяемые остатки в каждом случае рассматривались в поле жесткой циклической структуры гексадекапептида в состояниях, отвечающих низкоэнергетическим структурным вариантам фрагмента $\text{Cys}^{16}\text{-Cys}^{20}$. В свободном состоянии пентапептид обладает большой конформационной свободой, и поэтому были опробованы все возможные для него формы основной цепи. Минимизация энергии показала, что структуре $\text{Met}^1\text{-Cys}^{16}$ с дисульфидной связью $\text{S}_{(2)}\text{-S}_{(16)}$ комплементарна лишь одна форма фрагмента $\text{Cys}^{16}\text{-Cys}^{20}$, а именно $\text{B}^{16}\text{-B}^{17}\text{-R}^{18}\text{-R}^{19}\text{-R}^{20}$. Только в этом случае имеет место полная компенсация отрицательной и положительной энергии электростатических взаимодей-

ствий Arg¹⁷ соответственно с Asp¹¹ (–2,78 ккал/моль) и с Met¹, Arg⁹ (+2,70 ккал/моль), а также образование ряда стабилизирующих контактов между удаленными по цепи остатками. Наиболее существенны из них взаимодействия Met³ и Ala¹³ с Cys¹⁹–Cys²⁰ (–9,5 ккал/моль), Phe⁶ с Cys¹⁹–Cys²⁰ (–2,6 ккал/моль) и Pro⁴ с Cys¹⁹ (–1,0 ккал/моль). Интересно, что именно в глобальной конформации участка Met¹–Cys²⁰ сближенными автоматически оказываются боковые цепи Cys⁵ и Cys¹⁹, для которых образование дисульфидной связи не ведет к заметной дестабилизации ранее сложившихся невалентных взаимодействий. В принципе возможен и мостик S₍₅₎–S₍₂₀₎, однако его образование сопровождается повышением энергии более чем на 10 ккал/моль. Таким образом, независимое рассмотрение конформационных возможностей фрагментов инсектотоксина Met¹–Cys²⁰ и Ala¹⁸–Cys³³ приводит к непротиворечивым заключениям о предрасположенности первого к образованию дисульфидной связи S₍₅₎–S₍₁₉₎, а второго – к S₍₂₀₎–S₍₃₃₎.

Завершающий этап расчета пространственного строения инсектотоксина свелся к упаковке двух жестких структур (перекрывающихся и связанных между собой мостиками S₍₅₎–S₍₁₉₎ и S₍₂₀₎–S₍₃₃₎ фрагментов Met¹–Cys²⁰ и Ala¹⁸–Cys³³) и определению конформационного состояния С-концевого трипептида Gly³⁴–Asp³⁶ (см. рис. III.20). При объединении двух половин молекулы в единую структуру возникли некоторые стерические осложнения. Тем не менее рассчитанные конформации свободных фрагментов Met¹–Cys²⁰ и Ala¹⁸–Cys³³ следует считать комплементарными друг другу, поскольку: 1) все наталкивания снимаются при незначительной коррекции двугранных углов нескольких боковых цепей, по существу не изменяющей их прежних конформационных состояний; 2) снятие наталкиваний приводит к образованию новых стабилизирующих контактов. Оптимальное положение трипептидного участка Gly³⁴–Asp³⁶ выбрано путем количественной оценки всех его низкоэнергетических конформаций в потенциальном поле структуры Met¹–Cys³³.

В табл. III.16 даны геометрические параметры дисульфидных связей, которые вполне удовлетворительно соответствуют экспериментальным значениям: длине S–S-связи (2,04 Å), расстояниям C^β...S (3,05 Å) и C^β...C^β (3,8 Å при *гош*- и 4,8 Å при *транс*-ориентациях дисульфидной связи). В найденной структуре инсектотоксина геометрия всех 36 остатков отвечает наиболее предпочтительным конформациям соответствующих свободных монопептидов (CH₃–CONH–C^αHR–CONH–CH₃). Суммарный эффект средних взаимодействий составил –180 ккал/моль. На некоторых участках последовательности выбор конформационных состояний остатков только за счет средних взаимодействий практически однозначен (особенно в отношении формы основной цепи). В этих случаях соответствующие фрагменты образуют конформационно жесткие нуклеации. У инсектотоксина к таким участкам можно отнести Met¹–Pro¹⁰ (Met¹–Cys¹⁶) и Cys²⁶–Cys³¹. На других участках последовательности средние взаимодействия сокращают число возможных конформационных состояний остатков и определяют для них ограниченные наборы приблизительно равновероятных структурных вариантов. Функция дальних взаимодействий по отношению к конформационно жестким по средним взаимодействиям

**Геометрические параметры дисульфидных связей
в трехмерной структуре инсектотоксина I₁**

Cys ⁱ -Cys ^j	Расстояния, Å			
	S _i -S _j	C ^β _i ...S _j	S _i ...C ^β _j	C ^β _i ...C ^β _j
Cys ² -Cys ¹⁶	2,0	3,2	3,2	3,9
Cys ⁵ -Cys ¹⁹	2,0	3,3	3,3	4,0
Cys ²⁰ -Cys ³³	2,0	3,0	3,0	4,4
Cys ²⁶ -Cys ³¹	2,0	3,0	2,9	4,1

фрагментам сводится к дополнительной стабилизации, а также к большому ограничению свободы боковых цепей и, возможно, к незначительной корректировке формы основной цепи.

По отношению к конформационно лабильным участкам последовательности функция дальних взаимодействий заключается в выборе из равновероятных по средним взаимодействиям состояний единичных конформаций, обеспечивающих образование между ними и нуклеациями эффективных контактов, а также сближенность комплементарных друг другу нуклеаций. Так, расчет инсектотоксина показал, что значительно большей подвижностью по сравнению с нуклеациями обладают в свободном состоянии фрагменты Arg¹⁷-Lys²⁵ и Gly³⁴-Asp³⁶. Однако когда они встраиваются в общую цепь, их конформации полностью детерминированы. О высокой степени согласованности всех межостаточных взаимодействий свидетельствует тот факт, что у рассмотренных фрагментов инсектотоксина независимо от их длины конформационные состояния, входящие в нативную структуру молекулы, оказывались одними из самых предпочтительных, а во многих случаях глобальными; их энергия была всегда меньше, чем у большинства структурных вариантов, отобранных для последующего анализа.

В расчете инсектотоксина учитывались внутримолекулярные ван-дер-ваальсовы, электростатические и торсионные взаимодействия и водородные связи применительно к условиям водного окружения. Каковы же вклады этих взаимодействий в энергию найденной конформации молекулы? Аминокислотная последовательность инсектотоксина включает восемь остатков (около четверти всего состава), несущих шесть положительных и три отрицательных целочисленных заряда. Общая энергия межостаточных электростатических взаимодействий равна 36,9 ккал/моль. Дестабилизирующий эффект обусловлен электростатическими взаимодействиями между всеми смежными остатками, вклад которых (65 ккал/моль), однако, можно считать постоянным из-за малой чувствительности этих взаимодействий к конформационным состояниям близко расположенных остатков. Поэтому суммарный эффект влияющих на конформацию молекулы электростатических взаимодействий между всеми другими остатками имеет стабилизирующий характер (-28,1 ккал/моль). Боковые цепи заряженных остатков обращены в сторону растворителя. В расчете не были

**Энергия внутри- и межостаточных взаимодействий
в трехмерной структуре инсектотоксина I₁**

Вид энергии	Энергия взаимодействий, ккал/моль	
	Внутриостаточные	Межостаточные
$U_{\text{вдв}}$	-93,5	-285,5
$U_{\text{вс}}$	-1,0	-12,1
$U_{\text{эл}}$	+14,0	+36,9
$U_{\text{торс}}$	+27,4	-
$U_{\text{общ}}$	-52,3	-260,7

сделаны специальные предположения на этот счет, и такая ориентация положительно заряженных групп боковых цепей Arg⁹, Arg¹⁷, Arg²³, Lys²¹, Lys²⁵, Asp¹¹ и Asp³⁶, а также полярных групп остатков Thr⁷, Thr⁸, Gln¹⁴, Gln¹⁵ и Gln³⁰ получена при фрагментарном анализе и учете всех видов взаимодействий автоматически. Стабилизирующий вклад электростатических взаимодействий заряженных остатков составляет -33,6 ккал/моль, а дестабилизирующий - +27,2 ккал/моль, т.е. происходит почти полная компенсация противоположных эффектов. При учете электростатических взаимодействий были использованы парциальные заряды на атомах, предложенные в работе Р. Скотта и Г. Шераги [104], и величина диэлектрической проницаемости $\epsilon = 10$ [105]. Учитывая водное окружение, ослабленными предполагались также водородные связи; их энергию при оптимальной длине принимали равной -1,5 ккал/моль. Суммарный стабилизирующий эффект водородных связей составил -13,1 ккал/моль. Очевидно, что в найденной структуре инсектотоксина реализуемые 20 водородных связей обусловлены сложным комплексом многих межостаточных взаимодействий, среди которых собственно водородные связи играют незначительную роль.

Общая энергия торсионных взаимодействий в найденной структуре инсектотоксина равна 27,4 ккал/моль, т.е. 0,75 ккал/моль на остаток. Из этого следует, что взаимные расположения практически всех атомных групп основных и боковых цепей аминокислотных остатков отвечают минимумам торсионных потенциалов. В табл. III.17 приведены величины общей энергии внутри- и межостаточных взаимодействий и энергетические вклады отдельных видов взаимодействий. Из данных таблицы очевидно, что доминирующую роль в стабилизации структуры играют вандер-ваальсовы, точнее, дисперсионные взаимодействия.

Опишем предполагаемый путь самоорганизации пространственного строения молекулы инсектотоксина от полностью развернутой формы до нативной трехмерной структуры, опираясь на полученные в расчете данные о конформационных возможностях конкретной последовательности и ее отдельных фрагментов. Процесс свертывания полипептидной цепи начинается одновременно и независимо на двух участках с образования за счет средних взаимодействий нуклеаций Met¹-Cys¹⁶ и Cys²⁶-Cys³¹. В результате оказываются сближенными остатки Cys², Cys¹⁶ и Cys²⁶, Cys³¹

Образование между ними дисульфидных мостиков не сопровождается заметным изменением геометрии и, следовательно, не приводит к рассогласованности сложившихся у линейных последовательностей стабилизирующих межостаточных взаимодействий. Обе нуклеации входят в трехмерную структуру инсектотоксина без существенных изменений. Промежуточный Arg¹⁷–Lys²⁵ и С-концевой Gly³⁴–Asp³⁶ участки, более подвижные, но обладающие предрасположенностью к формам цепи, комплементарным образовавшимся циклическим нуклеациям, детерминируют свои состояния. При этом за счет многочисленных стабилизирующих контактов происходит сближение остатков Cys⁵, Cys¹⁹ и Cys²⁰, Cys³³. Между ними, также не вызывая стерических осложнений, образуются еще две цистеиновые пары. Результаты расчета, проведенного по описанной схеме (см. рис. III.20), устанавливают для инсектотоксина I₁ следующую систему дисульфидных связей:

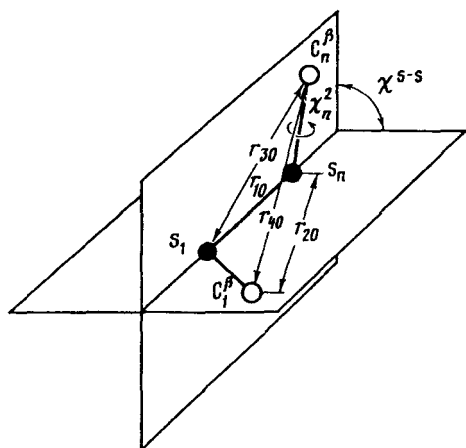
I 2–16 5–19 20–33 26–31.

Образование каждой пары осуществлялось по одному механизму, в основе которого лежат конформационные свойства природной аминокислотной последовательности. Во всех случаях сближенность соответствующих остатков Cys происходила, как и у апамина, тертиапина и MCD-пептида, в энергетически самых предпочтительных конформационных состояниях линейных участков; создание дисульфидных связей S₍₂₎–S₍₁₆₎ и S₍₂₆₎–S₍₃₁₎ не только не затруднило, а, напротив, предопределило возможность образования двух других дисульфидных связей.

10.6. НЕЙРОГИПОФИЗАРНЫЕ НОНАПЕПТИДНЫЕ ГОРМОНЫ

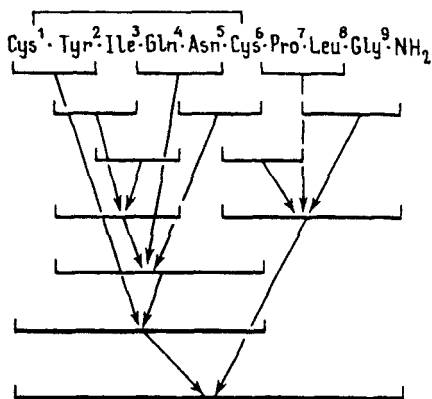
Рассмотренные результаты априорных расчетов апамина, тертиапина, MCD-пептида и инсектотоксина I₁ свидетельствуют о том, что не дисульфидные связи определяют пространственное строение молекулы природного пептида, а, напротив, конформационные свойства линейной аминокислотной последовательности диктуют избирательную сближенность остатков цистеина. Предпосылки для окислительной реакции атомов серы обусловлены стерической предрасположенностью соответствующих участков пептидной цепи к таким конформационным состояниям, в которых остатки Cys расположены недалеко друг от друга и их боковые цепи имеют необходимую для создания S–S-мостика взаимную ориентацию. Сближенность Cys в самых низкоэнергетических конформациях линейных последовательностей достигается за счет согласованных стабилизирующих невалентных взаимодействий между всеми остатками цепи. Валентному связыванию атомов S–S предшествует создание на одних участках цепи жестких нуклеаций, а на других – конформационно лабильных состояний.

Резко отличающиеся по своим конформационным свойствам участки выполняют разные функции, в равной мере необходимые для того, чтобы процесс образования дисульфидной связи совершался быстро, спонтанно и безошибочно. Благодаря нуклеациям он становится не статистическим, а детерминированным; лабильные участки локализуют и делают низко-



Р и с. III.21. Дисульфидный мостик в *gauche*-конфигурации

$r_{10} = 2,04$, $r_{20} = 3,05$ и $r_{30} = 3,865 \text{ \AA}$



Р и с. III.22. Схема конформационного анализа молекулы окситоцина

энергетическими все изменения геометрии пептидной цепи, которые неизбежны при сближении атомов S на валентное расстояние. В исследованиях пространственной организации упомянутых цистинсодержащих пептидов не использовалась информация о местах локализации дисульфидных связей. И тем не менее во всех случаях найденные глобальные конформации молекул отвечали геометрическим условиям создания правильной системы этих связей. Следовательно, можно констатировать, что знание цистеиновых пар не имеет принципиального значения для предсказания на основе теории и метода конформационного анализа структур природных пептидов и белков. Учет такой информации может существенно сократить число рассматриваемых в ходе анализа структурных вариантов.

При учете локализации S-S-мостика конформационный анализ цистинсодержащего фрагмента природного олигопептида или белка может быть ограничен рассмотрением его состояний только с замкнутыми формами основной цепи. Значительное сокращение объема вычислительных работ не сопровождается при этом снижением требований к строгости решения задачи. В этом случае для пептида определенной длины необходимо располагать набором соответствующих циклических структур с известными геометрическими и энергетическими характеристиками. Он может быть получен путем количественной оценки стерической и энергетической предрасположенности всех возможных конформаций модельного пептида того же размера $\text{Cys}^1-(\text{Ala})_{n-2}-\text{Cys}^n$ к образованию дисульфидной связи. В работах В.З. Спасова и Е.М. Попова [106, 107] оценены конформационные возможности модельных олигопептидов с числом остатков n от двух до шести. При большей длине цепи с концевыми остатками Cys предложенный метод становится малоэффективным.

Для получения циклических конформаций с учетом геометрических

**Энергия внутри- и межостаточных невалентных взаимодействий
в конформациях Cys¹-(Ala)_{n-2}-Cysⁿ**

Пептид	Энергия взаимодействий, ккал/моль		$\Delta U_{\text{общ}}$	Число возможных конформаций с S-S-связью
	без S-S-связи	с S-S-связью		
Cys ¹ -Cys ²	-3,2	-	-	0
Cys ¹ -Ala ² -Cys ³	-6,5	-3,5	3,0	3
Cys ¹ -Ala ² -Ala ³ -Cys ⁴	-9,8	-7,5	2,3	3
Cys ¹ -Ala ² -Ala ³ -Ala ⁴ -Cys ⁵	-12,6	-14,8	-2,2	33
Cys ¹ -Ala ² -Ala ³ -Ala ⁴ -Ala ⁵ -Cys ⁶	-15,2	-17,7	-2,5	74

параметров дисульфидных связей была использована процедура, предложенная в работе [108]. В уравнение конформационной энергии был включен дополнительный член, описываемый потенциалом

$$U^{S-S} = B \sum_{i=1}^3 (r_i - r_{i0})^2 + A(r_4 - r_{40})^2,$$

где: $B = 100$ ккал/моль – коэффициент упругости пружины, стягивающей атомы S^B и S ; r_1, r_2, r_3 и r_4 – переменные расстояния между атомными парами $S_i-S_j, C_i^B \dots S_j, S_i \dots C_j^B, C_i^B \dots C_j^B$; r_{10}, r_{20}, r_{30} и r_{40} – соответствующие равновесные расстояния при значениях угла вращения ($\chi^{S-S} = \pm 90^\circ$) вокруг связи S_i-S_j , отвечающих двум минимумам торсионного потенциала – $U(\chi^{S-S}) = A(r_4 - r_{40})^2$, где $A = 10$ ккал/моль (рис. III.21). При этой величине параметра A барьер вращения при $\chi^{S-S} = 0$ и 180° равен ~7 ккал/моль, что соответствует опытному значению.

Ориентировочную оценку вероятности образования S-S-мостика в пептидах Cys¹-(Ala)_{n-2}-Cysⁿ ($n = 2-6$) может дать сопоставление величин энергии внутри- и межостаточных взаимодействий глобальных циклических конформаций и соответствующих им структур с развернутой формой основной цепи (β -складчатый лист). Как видно из табл. III.18, в которой приведены итоговые результаты расчета, образование дисульфидной связи становится предпочтительным по энергии невалентных взаимодействий между остатками, начиная с пентапептида. Здесь происходит и энтропийный скачок – резкое увеличение конформаций, стерически удовлетворяющих условиям образования S-S-мостика. Следующее из этих данных заключение отвечает реальной ситуации, касающейся дисульфидных связей в белках. Действительно, известно лишь несколько примеров образования S-S-связей на тетрапептидном белковом участке, причем почти все они включают остаток Gly. Число связей на пентапептидном участке значительно возрастает. Еще чаще встречаются в белках цистинсодержащие гексапептидные циклы. Однако не известно ни одного случая образования дисульфидной связи между цистеинами, находя-

Аминокислотная последовательность нейрогипофизарных гормонов

Гормон	Последовательность
Окситоцин	Cys ¹ -Tyr ² -Ile ³ -Gln ⁴ -Asn ⁵ -Cys ⁶ -Pro ⁷ -Leu ⁸ -Gly ⁹ -NH ₂
Вазопрессин	Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH ₂
Вазотоцин	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Glv-NH ₂
Мезотоцин	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Ile-Gly-NH ₂

щимися в белковой цепи в положениях 1–2 и 1–3. Найденные наборы структур пента- и гексапептидного циклов с S–S-мостиком существенно облегчают расчет пространственного строения соответствующих природных молекул или отдельных фрагментов любого аминокислотного состава. Так, в случае пентапептидов цикло-[Cys¹-(X)₃-Cys⁵] из 972 возможных структурных вариантов требуется рассмотрение лишь 33 циклических форм пептидного остова, замкнутого дисульфидной связью, а в случае гексапептидов цикло-[Cys¹-(X)₄-Cys⁶] вместо 2916 – только 74, энергия которых попадает в широкий интервал 0–10 ккал/моль. Данные расчета последнего модельного пептида были использованы в конформационном анализе ряда нейрогормонов [106, 107].

Аминокислотные последовательности четырех нейрогипофизарных гормонов – окситоцина, вазопрессина, вазотоцина и мезотоцина, пространственная организация которых рассматривается ниже, представлены в табл. III. 19. Гормоны являются нонапептидами, у которых в первом и шестом положениях находятся остатки цистеина, связанные между собой дисульфидными мостиками. Исследование конформационных возможностей каждой молекулы выполнено независимо и полностью априорно. Несмотря на близкое химическое строение и наличие у всех молекул дисульфидной связи Cys¹-Cys⁶, нейрогормоны образуются из разных предшественников, имеющих отдельные генетические механизмы контроля. и играют разную физиологическую роль в функционировании различных органов и тканей. Окситоцин является ключевым гормоном в родовой деятельности, что находит отражение в самом названии пептида. Вазопрессин – основной фактор регуляции функции почек в отношении водно-солевого обмена – оказывает антидиуретическое действие. Нейрогипофизарные гормоны влияют на метаболизм. При их введении в организм это проявляется в изменении углеводного, жирового и белкового обмена. Известные количественные характеристики биологической активности двух наиболее изученных гормонов нейрогипофизы – окситоцина и вазопрессина, свидетельствуют об избирательности и эффективности работы гормонов. Вместе с тем они также показывают способность вазопрессина, окситоцина и, вероятно, других нейрогормонов оказывать при соответствующих дозах влияние на все процессы, спектр которых довольно широк, т.е. быть в определенной мере взаимозаменяемыми.

На основе общих соображений и данных физико-химических методов трудно составить полное представление о характере связи между пространственной организацией нейрогипофизарных гормонов и их функциями.

ми. О структурно-функциональной организации пептидов будет подробно рассказано в следующем томе. Сейчас же мы обращаем внимание лишь на то обстоятельство, что реализация физиологических свойств этих соединений предъявляет на первый взгляд весьма противоречивые требования к конформационным свойствам молекул. С одной стороны, высокая специфичность влияния вазопрессина и окситоцина на деятельность различных органов-мишеней, казалось бы, указывает на разное и в то же время детерминированное для каждого из гормонов пространственное строение. С другой стороны, их полифункциональность и способность стимулировать, правда, с различной эффективностью одни и те же процессы требуют конформационной лабильности молекул и наличия в равновесии общих для вазопрессина и окситоцина структур. Очевидно, для понимания биологических свойств нейрогормонов прежде всего необходимо знать полные наборы предпочтительных, низкоэнергетических структур, отражающих потенцию молекул к конформационным изменениям. Это может быть достигнуто лишь с помощью теоретического подхода.

Не будем обсуждать все этапы конформационного анализа каждого гормона. Поскольку расчет всех нонапептидов выполнен по единому плану, будет достаточно остановиться на одном примере (выбран окситоцин), а затем сопоставить конечные результаты анализа, касающиеся конформационных возможностей четырех нейроголиофизарных гормонов. Изучению пространственного строения всей молекулы окситоцина предшествовало независимое рассмотрение двух ее частей: гексапептидного участка цикло-(Cys¹-Cys⁶) и линейного тетрапептидного Cys⁶-Gly⁹-NH₂. Выше отмечалось, что полученные нами данные для модельного соединения цикло-[Cys¹-(Ala)₄-Cys⁶] значительно сокращают (в ~ 40 раз) количество подлежащих расчету структурных вариантов первого окситоцинового участка. Тем не менее его анализ, учитывающий все возможные конформационные состояния боковых цепей остатков между Cys¹ и Cys⁶, все еще остается громоздким и требует фрагментарного подхода. Схема разделения аминокислотной последовательности окситоцина на фрагменты и порядок рассмотрения их конформационных возможностей приведены на рис. III. 22. Конформационные состояния монопептидов, положенные в основу расчета дипептидных фрагментов, представляют собой предпочтительные конформации соответствующих молекул метиламидов N-ацетил-α-аминокислот, энергия которых находится в интервале 0–2,0 ккал/моль (см. табл. II. 17). Обратимся сразу к результатам расчета циклического гекса- и линейного тетрапептидных участков окситоцина.

Исходные приближения фрагмента цикло-(Cys¹-Tyr²-Ile³-Gln⁴-Asn⁵-Cys⁶) сформированы из предпочтительных состояний Cys¹-Tyr² и Tyr²-Cys⁶, комбинации которых отвечают 74 циклическим конформациям моделей молекулы цикло-[Cys¹-(Ala)₄-Cys⁶]. Всего было рассчитано 300 структурных вариантов участка цикло-(Cys¹-Cys⁶) окситоцина. Следовательно, каждая из 27 форм пептидного остова, обеспечивающая образование дисульфидной связи, была представлена несколькими низкоэнергетическими конформациями, которые различались между собой ориентациями боковых цепей не только цистеинов, но и других остатков. Минимизация энергии при варьировании всех двугранных углов φ, ψ и

х выявила резкую энергетическую дифференциацию конформаций фрагмента цикло-(Cys¹-Cys⁶). Наиболее предпочтительные конформации восьми форм основной цепи циклического гексапептида с величинами $U_{\text{общ}} = 0-12,0$ ккал/моль были включены в расчет всей молекулы окситоцина. Интересно, что глобальная конформация данного фрагмента имеет форму основной цепи В-В-Р-Р-В-В, которая отвечает одной из самых выгодных конформаций модельной молекулы цикло-[Cys¹-(Ala)₄-Cys⁶]. Энергия стабилизирующих невалентных взаимодействий модельного соединения в этой конформации равна -14,6 ккал/моль, причем -7,6 ккал/моль вносят внутриостаточные, а -7,0 ккал/моль – межостаточные взаимодействия. У конформации гексапептидного цикла окситоцина с той же формой основной цепи и той же конфигурацией мостика S-S энергия стабилизации составляет -42,1 ккал/моль; на долю внутриостаточных контактов приходится -18,5 ккал/моль, а доля межостаточных -23,6 ккал/моль. Для окситоцинового цикла величины -7,6 и -7,0 ккал/моль можно рассматривать в качестве максимальных стабилизирующих эффектов соответствующих скелетных взаимодействий, т.е. взаимодействий между элементами основной цепи, включающими группы C^βH₂, и дисульфидным мостиком. Поэтому разности между энергией внутри межостаточных контактов в пептидах цикло-(Cys¹-Tyr²-Ile³-Gln⁴-Asn⁵-Cys⁶) и цикло-[Cys¹-(Ala)₄-Cys⁶] (соответственно -10,9 и -16,6 ккал/моль) являются минимальными вкладами взаимодействий боковых цепей (точнее, атомных групп при C^βH₂) остатков в положениях 2-5. Значительность этих величин указывает на чрезвычайно большую роль, которую могут играть боковые цепи (иными словами, природа аминокислотных остатков между Cys¹ и Cys⁶) в выборе структуры гексапептидного цикла. Следовательно, в конформационном анализе последовательностей с S-S-мостиком 1-6 необходимо рассматривать все состояния 27 форм основной цепи.

Рассмотрим конформационные возможности линейного тетрапептидного фрагмента окситоцина Cys⁶-Pro⁷-Leu⁸-Gly⁹-NH₂. Известно, что остаток Pro не только сам имеет ограниченную конформационную свободу в областях В и R, но и значительно затрудняет подвижность предшествующего остатка, обуславливая для него энергетическую предпочтительность форм В и L. Поскольку во всех предпочтительных структурах циклического гексапептида значения угла $\phi_6 < 0^\circ$, то в анализе тетрапептида для остатка Cys принята В-форма основной цепи. Всего для минимизации энергии было составлено 144 варианта фрагмента Cys⁶-Gly⁹-NH₂ четырех возможных структурных типов пептидного скелета (*eee*, *eef*, *efe* и *eff*). Как следует из расчетов, наиболее представителен по числу низкоэнергетических состояний тип основной цепи *eff*. Исходные приближения для анализа всей молекулы окситоцина были составлены соответственно из 8 и 10 низкоэнергетических конформаций гекса- и тетрапептидных фрагментов. Минимизация их энергии по всем двугранным углам основной и боковой цепей свидетельствует о нереальности подавляющего большинства рассмотренных конформаций. В широкий энергетический интервал 0-9,0 ккал/моль из 80 состояний попадает лишь 20. Глобальная конформация окситоцина состоит из самых выгодных состояний гексапептидного цикла и тетра-

пептидного участка. Объединение фрагментов в молекулы приводит к возникновению взаимодействий между ними, общая энергия которых составляет $-4,5$ ккал/моль. Новые взаимодействия не нарушают стабилизирующих контактов, сложившихся между остатками у свободных гекса- и тетрапептида. Следовательно, в глобальной конформации окситоцина имеет место полная согласованность всех взаимодействий. Иными словами, форма основной цепи этой конформации, с одной стороны, в максимальной степени удовлетворяет взаимодействиям на каждом отдельном участке окситоцина, а с другой — оказывается предрасположенной к образованию выгодных контактов между всеми участками молекулы. Такой формой обладают еще несколько конформаций, энергия которых выше всего на $1-2$ ккал/моль. Они различаются между собой ориентациями боковых цепей. При одной форме основной цепи цикла возможно также несколько форм у С-концевого участка молекулы.

Глобальная конформация имеет четыре пептидные водородные связи $(\text{Tyr}^2)\text{NH}\dots\text{OC}(\text{Asn}^5)$, $(\text{Tyr}^2)\text{CO}\dots\text{HN}(\text{Asn}^5)$, $(\text{Cys}^6)\text{NH}\dots\text{OC}(\text{Gly}^9)$ и $(\text{Cys}^6)\text{CO}\dots\text{HN}(\text{Gly}^9)$ и одну связь между боковыми цепями $(\text{Gln}^4)\text{NH}\dots\text{OC}(\text{Asn}^5)$. Расчет проводили применительно к водной среде, предполагая водородные связи ослабленными. Поэтому их стабилизирующий эффект невелик. Конформационная устойчивость обусловлена главным образом дисперсионными контактами между остатками. Конформационные состояния всех остатков в глобальной конформации отвечают наиболее низкоэнергетическим конформациям свободных монопептидов. Оптимальные, выгодные положения боковых цепей определяются не стерическими ограничениями, а стабилизирующими взаимодействиями друг с другом и элементами основной цепи. Поэтому возможны низкоэнергетические и взаимосвязанные изменения конформаций боковых цепей. Наилучшая конформация другой формы основной цепи $\text{B}^1\text{--R}^2\text{--R}^3\text{--B}^4\text{--B}^5\text{--B}^6\text{--R}^7\text{--R}^8\text{--B}^9$ (*efffeeff*) уступает глобальной всего на величину $1,2$ ккал/моль. Она построена из конформационного состояния циклического гексапептида с $U_{\text{общ}} = 1,6$ ккал/моль и лучшего состояния тетрапептида ($U_{\text{общ}} = 0$ ккал/моль). Пептидный остов этой конформации имеет S-образный вид и расположен приблизительно в одной плоскости. Энергия взаимодействия циклического и С-концевого линейного фрагментов составляет $-7,5$ ккал/моль; здесь также образование контактов между удаленными остатками не ведет к дестабилизации отдельных участков молекулы. Имеются три водородные связи: $(\text{Cys}^6)\text{NH}\dots\text{OC}(\text{Gly}^9)$ (основная цепь), $(\text{Gln}^4)\text{NH}_2\dots\text{OC}(\text{Asn}^5)$ (боковая цепь — основная цепь) и $(\text{Gln}^4)\text{NH}\dots\text{OC}(\text{Gln}^4)$ (основная цепь — боковая цепь). Геометрические параметры дисульфидной связи у двух самых предпочтительных структур окситоцина ($U_{\text{общ}} = 0$ и $1,2$ ккал/моль) совпадают с экспериментальными значениями, а связи $\text{C}_{(1)}^\beta\text{--S}_{(1)}$ и $\text{C}_{(6)}^\beta\text{--S}_{(6)}$ находятся в *gash*-положении (соответственно $\chi^{\text{S--S}} = -97$ и -102°), что отвечает минимальному вкладу торсионной составляющей.

Небольшой энергией ($U_{\text{общ}} = 4,1$ ккал/моль) обладает конформация $\text{B}^1\text{--B}^2\text{--R}^3\text{--R}^4\text{--R}^5\text{--B}^6\text{--B}^7\text{--R}^8\text{--L}^9$ (*eefffeee*). Она имеет сначала развернутую форму основной цепи, затем в середине молекулы образует виток непра-

вильной α -спирали и вновь становится развернутой. Эта конформация в отличие от двух рассмотренных структур окситоцина имеет более свернутый, клубкообразный вид.

Значения двугранных углов ϕ , определенные по функциональной зависимости [109] из наблюдаемых величин вицинальных констант $^3J_{\text{NH}-\text{C}^\alpha\text{H}}$ в водном растворе [110, 111], отвечают следующим интервалам: $\phi(\text{Tyr}^2)$ $-140 \div -160^\circ$, $\phi(\text{Ile}^3)$ $-60 \div -80^\circ$; $\phi(\text{Gln}^4)$ $-60 \div -7-0^\circ$; $\phi(\text{Asn}^5)$ $140 \div 160^\circ$, $\phi(\text{Cys}^6)$ $-150 \div -170^\circ$; $\phi(\text{Leu}^8)$ $-60 \div -80^\circ$. Значения углов ϕ у глобальной конформации окситоцина типа *eeffeff* хорошо согласуются с экспериментальными. Имеющие место небольшие отклонения, на наш взгляд, вполне закономерны, учитывая изоэнергетичность структурных вариантов пептидной цепи в области взаимосвязанных вариаций двугранных углов $\psi_i - \phi_{i+1}$, с одной стороны, и приближенность эмпирической корреляции, использованной для определения области значения ϕ по величине $^3J_{\text{NH}-\text{C}^\alpha\text{H}}$ — с другой. К этому следует добавить, что глобальная конформация находится в равновесии с рядом других более высокоэнергетичных структур, что должно влиять на опытные величины $^3J_{\text{NH}-\text{C}^\alpha\text{H}}$. Таким образом, найденная из расчета глобальная конформация окситоцина полностью отвечает данным ЯМР в водном растворе.

В работе [111] сделана ориентировочная оценка относительной заселенности ротамеров по углу χ_1 боковых цепей некоторых остатков окситоцина с использованием констант $J_{\alpha\beta}$, $J_{\alpha\beta'}$ и $J_{\beta\beta'}$. Из сравнения опытных данных с результатами расчета следует, что теоретические значения углов χ_1 в глобальной конформации соответствуют наиболее вероятным состояниям боковых цепей, предложенным в работе [111]. В ходе анализа было обнаружено, что в конформациях типа *eeffeff* состояния остатков Tyr^2 , Gln^4 , Asn^5 с $\chi_1 \sim 60^\circ$ менее выгодны по стерическим причинам, что объясняет их меньшую заселенность. Спектр комбинационного рассеяния в области валентного колебания S—S, согласно данным [112], свидетельствует в пользу преимущественно *гош*-ориентации группы C—S—S—C ($90 \pm 30^\circ$), а согласно [113], — *гош-гош-гош*-ориентации группы C—C—S—S—C—C. Оба заключения полностью согласуются с расчетными значениями углов $\chi_2(\text{Cys}^1)$, χ^{S-S} и $\chi_2(\text{Cys}^6)$ (82 , -97 и 106°). Реализация в глобальной конформации водородной связи $(\text{Tyr}^2)\text{CO} \dots \text{HN}(\text{Asn}^5)$ подтверждается температурной зависимостью химического сдвига амидного протона Asn^5 , но длина водородной связи на $\sim 0,5$ Å больше оптимальной. Следует отметить, что в конформации, непосредственно следующей за глобальной в энергетической шкале, подобная связь отсутствует. Таким образом, сравнение данных физико-химических исследований окситоцина с результатами расчета дает основание полагать, что последние правильно отражают реальные конформационные свойства молекулы и геометрические характеристики ее равновесных структур. К аналогичному выводу приводит сопоставление результатов расчета окситоцина с данными рентгеноструктурного анализа его близкого аналога — дезаминокситоцина [58,59]. В кристалле были обнаружены две модификации молекулы нона

пептида, геометрия которых отвечает двум наиболее предпочтительным конформациям гормона с относительной энергией 0 и 1,2 ккал/моль.

Сопоставим теперь изложенные результаты теоретического конформационного анализа [106, 107] с результатами, полученными в работе Г.В. Никифоровича и соавт. [114]. Прежде всего отметим, что результаты двух расчетов весьма близки. Этот факт представляет интерес, поскольку в этих исследованиях были использованы разные подходы и системы параметров потенциальных функций. В обеих работах глобальная конформация окситоцина имеет одну форму основной цепи, относящуюся к структурному типу *eeffeff*. Значения всех двугранных углов пептидного остова совпадают с точностью 10–20°. Имеющиеся различия в конформационных состояниях некоторых боковых цепей не принципиальны, так как они практически изоэнергетичны (~1 ккал/моль) и отражают конформационную лабильность остатков. Важно отметить и полное совпадение величин относительной энергии в лучших конформациях другого структурного типа – *eeffeee* (4,1 и 4,4 ккал/моль). Это показывает, что в детальных исследованиях метод теоретического конформационного анализа приводит к одним и тем же результатам, т.е. оказывается малочувствительным к выбору системы параметров. Нельзя сравнить геометрию дисульфидной связи в обеих работах, поскольку в работе [114] не приведены значения двугранных углов χ_2 и χ^{S-S} остатков Cys. По-видимому, выбранная в работе процедура отбора конформаций на начальном этапе исследования циклической части окситоцина более жесткая, чем в нашем случае. Этим можно объяснить пропуск конформации структурного типа *effeeff*, лучшая из которых имеет энергию 1,2 ккал/моль и непосредственно следует за глобальной (табл. III. 20).

Исследование конформационных возможностей трех других нонапептидных гормонов (вазопрессина, вазотоцина и мезотоцина) (см. табл. III. 19), как уже отмечалось, выполнено аналогичным образом и независимо от результатов расчета окситоцина. Полученные данные показали, что нейрогипофизарные гормоны имеют различное пространственное строение, которое в каждом случае не может быть охарактеризовано одной, жестко фиксированной структурой. В то же время молекулы окситоцина, вазопрессина, вазотоцина и мезотоцина не являются флуктуирующими клубками. Представление о возможных конформационных состояниях гормонов можно получить из табл. III. 20, в которой сопоставлены энергетические характеристики и вероятное процентное содержание конформаций низкой энергии. Приведенные данные позволяют сделать следующие выводы: 1) молекулы гормонов в растворе могут принимать несколько близких по энергии конформаций; 2) конформационные возможности исследованных гормонов могут быть описаны одним набором структур в основном четырех типов: *eeffeff*, *eeffeff*, *effeeff* и *ffffeeff*; 3) самая предпочтительная форма основной цепи каждого гормона представлена наибольшим числом низкоэнергетических состояний, т.е. выгодна не только по энтальпии, но и по энтропии; 4) различие в пространственной организации гормонов проявляется в положении конформационного равновесия, которое существенно меняется при переходе от одного соединения к другому. Поскольку в равновесии участвуют практически одни и те же конформации, специ-

Таблица III. 20

Конформация нейрогипофизарных гормонов

Гормон	Шейп	$U_{\text{общ}}$, ккал/моль	Содержание, %	Энергия взаимодействия, ккал/моль			$U_{\text{торс}}$, ккал/моль
				U_I	U_{II}	U_{I-II}	
Окситоцин	<i>eeffeeff</i>	0	88,0	-42,4	-9,3	-10,1	5,0
	<i>effeeeff</i>	1,2	11,8	-37,4	-9,3	-13,5	4,6
	<i>eefffeef</i>	4,1	0,2	-40,9	-8,7	-12,1	8,8
	<i>fffeeeff</i>	8,3	0,0	-35,6	-9,3	-8,4	4,8
Вазопрессин	<i>eefffeff</i>	0	78,0	-40,8	-13,5	-20,6	10,7
	<i>eeffeeff</i>	1,0	20,0	-42,0	-11,2	-13,7	3,7
	<i>fffeeeff</i>	2,5	2,0	-40,8	-11,4	-13,7	4,2
	<i>effeeeff</i>	8,8	0,0	-29,2	-12,4	-8,8	5,0
Вазотоцин	<i>eeffeeff</i>	0	68,0	-42,2	-11,0	-13,5	4,6
	<i>eefffeff</i>	0,8	32,0	-41,5	-10,7	-18,1	8,0
	<i>effeeeff</i>	8,1	0,0	-38,0	-13,6	-8,6	6,2
	<i>fffeeeff</i>	10,1	0,0	-35,8	-11,4	-9,0	4,2
Мезотоцин	<i>eeffeeff</i>	0	54,2	-41,6	-11,8	-12,0	4,6
	<i>eefffeff</i>	0,2	45,2	-41,2	-11,6	-16,9	9,1
	<i>effeeeff</i>	3,4	0,6	-38,8	-11,0	-12,7	5,2
	<i>fffeeeff</i>	9,3	0,0	35,8	-12,2	-7,3	3,8

П р и м е ч а н и е. U_I и U_{II} – энергии внутри- и межстаточных взаимодействий во фрагментах Cys¹–Cys⁶ (I) и Pro⁷–Gly⁹–NH₂ (II); U_{I-II} – энергия взаимодействия между фрагментами I и II. Содержание конформаций оценено по фактору Больцмана.

фичной для каждого гормона оказывается вероятность реализации той или иной структуры, а не ее геометрия. Актуальными для функционирования окситоцина можно считать конформации типа *eeffefff*, *effeeeff* и *eefffeee*, для вазопрессина – *eeffefff*, *eeffefff* и *effeeeff*, для вазотоцина – *eeffefff* и *eeffefff* и для мезотоцина – *eeffefff*, *eeffefff* и *effeeeff*.

Глава 11

ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ ЛИГАНДОВ ОПИАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

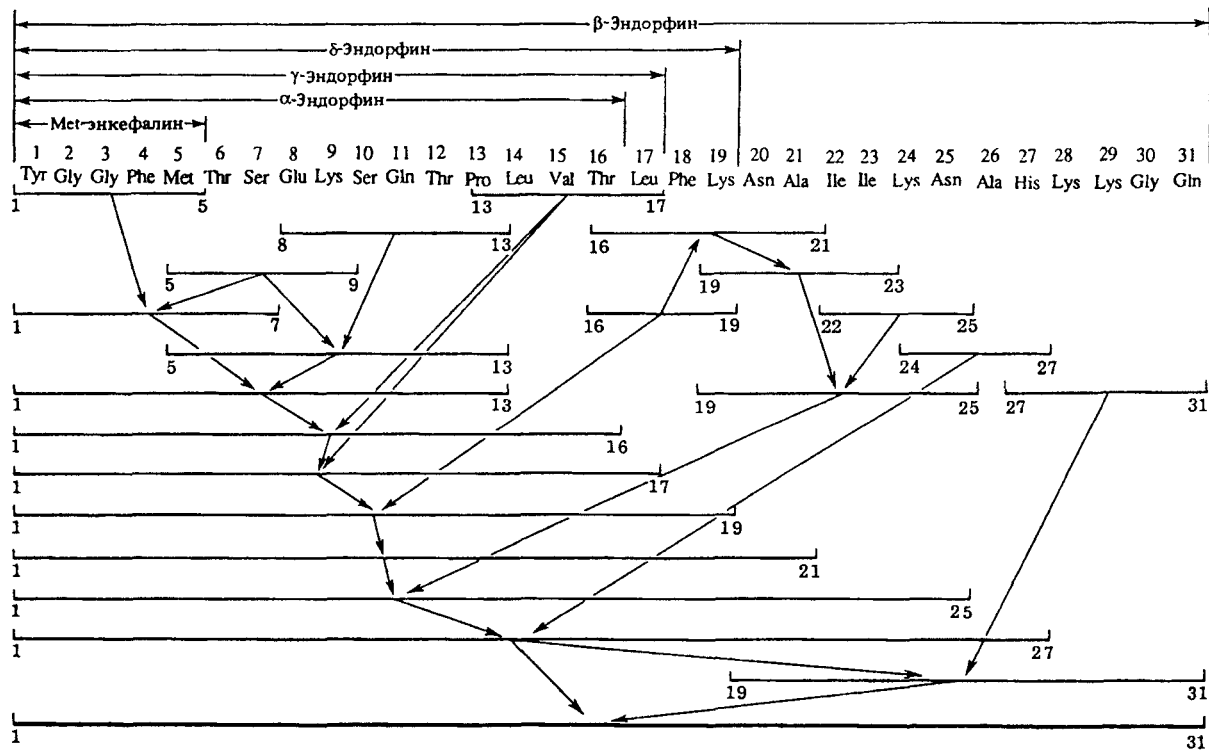
В предшествующей главе были рассмотрены результаты конформационного анализа ряда природных и модельных олигопептидов, аминокислотные последовательности которых содержали четное число цистеиновых остатков, соединенных в нативном состоянии молекул дисульфидными мостиками. Во всех случаях многоступенчатый расчет цистинсодержащих соединений автоматически приводил к таким самым низкоэнергетическим конформациям, которые оказывались предрасположенными к образованию правильной системы дисульфидных связей. В отсутствие прямых экспериментальных данных о пространственном строении рассмотренных пептидов, среди которых были и весьма сложные, этот факт являлся единственным, однако веским доводом в пользу правильности решения конкретных конформационных задач. Спонтанная сближенность в линейной цепи соответствующих остатков цистеина и следуемый из расчета порядок образования дисульфидных связей одновременно указывали на механизм свертывания природной последовательности в нативную конформацию. Поскольку расчет цистинсодержащих олигопептидов не выявил в их структурной организации особенностей, обусловленных наличием S–S-мостиков, то, очевидно, вытекающие из конформационного анализа макроциклических пептидов выводы самого общего характера могут быть распространены и на линейные пептиды, не обладающие дисульфидными связями. Наиболее ценным из них, пожалуй, является заключение о том, что физическая структурная теория и метод конформационного анализа, на основе которых были выполнены расчеты всех цистинсодержащих пептидов, приводят в исследовании пространственного строения последовательностей из нескольких десятков аминокислотных остатков к разумным количественным результатам.

По сравнению с конформационным анализом цистинсодержащих пептидов анализ чисто линейных последовательностей отягощен одним существенным моментом – расчет лишен здесь внутреннего контроля. Поскольку в отношении структурной организации этих соединений, как и пептидов с дисульфидными связями, прямой экспериментальный материал, как правило, отсутствует, а косвенный – далеко не всегда надежен, то результаты расчета часто оказываются фактически вне опытной проверки. И тем не менее проведение таких расчетов необходимо для достижения главной цели – априорного расчета трехмерных структур

белков, где возможно прямое количественное сопоставление теоретических и экспериментальных значений двугранных углов вращения или координат атомов. Без детального изучения конформационных возможностей представительного набора линейных олигопептидов нельзя было считать достаточным знание средних межостаточных взаимодействий, чтобы перейти к рассмотрению дальних взаимодействий, т.е. непосредственно к изучению структурной организации белков. Кроме того, изучение пространственного строения и динамических конформационных свойств низкомолекулярных природных пептидов представляет первостепенный интерес для выявления их структурно-функциональной организации и решения других вопросов естественнонаучного и практического значения. В этой и последующей главах рассмотрены результаты теоретического конформационного анализа серии нейропептидов.

В 1970–1980-х годах в эндокринологии произошли события чрезвычайной важности, качественно изменившие состояние этой области знаний. Не преследуя цель дать здесь исчерпывающий обзор всех событий, отметим основные вехи происшедшей перемены. Прежде всего был открыт новый класс биологически активных веществ – нейропептидов, т.е. эндогенных пептидов, регулирующих деятельность нервной системы, в первую очередь головного мозга. За короткое время получена детальная информация об их химической структуре, предшественниках, содержащих в своих аминокислотных последовательностях целые ансамбли разнообразных нейропептидов. Это дало толчок интенсивным исследованиям их биологического действия и механизмов регуляции и взаимосвязи с многочисленными функциями организма. Следующим существенным моментом явилось становление генной инженерии. В кратчайший срок удалось систематизировать данные о ранее известных нейропептидах и предсказать (что сразу же нашло подтверждение) существование новых представителей этого класса пептидов. Кроме того, стало реальным радикальное решение важнейшей проблемы – обеспечение практически неограниченного количества нейропептидов человека путем синтеза их с помощью микроорганизмов, а не экстракцией в ничтожных количествах из опухолей и органов умерших.

Исследования нейропептидов на новом уровне начались с выделения из нервной ткани и установления последовательности нескольких эндогенных пептидов, стереоспецифически связывающихся с опиатными рецепторами или вызывающих активацию определенной цепи внутриклеточных событий и соответствующий ответ клетки-мишени (т.е. агонистов) или уменьшающих и устраняющих такой ответ (антагонистов). В 1924 г. Р. Абелем в ткани мозга были обнаружены два активных пептида – окситоцин и вазопрессин, ответственных, как выяснилось значительно позднее, за антидиуретический, вазопрессорный и некоторые другие эффекты. В 1953 г. В. Дю Виньо впервые осуществил их химический синтез, а также вазотоцина и мезотоцина. Выделению эндогенных нейропептидов непосредственно предшествовало открытие в начале 1970-х годов в нервной ткани рецепторов, избирательно связывающих морфин, кодеин и другие экзогенные опиаты [115–117]. Следовательно, дальнейший поиск велся целенаправленно; в его основе лежала идея о необходи-



Р и с. III.23. Схема конформационного анализа молекул Мет-энкефалина, α-, γ-, δ- и β-эндорфинов

мости существования эндогенных лигандов для обнаруженных стереоспецифических мест узнавания. Первое доказательство наличия таких лигандов в организме удалось получить в 1974 г. Л. Терениусу и А. Вальстрему с помощью радиорецепторного анализа [118, 119]. Практически одновременно И. Хьюз и соавт. [120] выделили из экстрактов мозговой ткани свиньи вещество, обладающее аналогичным морфину анальгетическим действием. Существование опиоподобного фактора в виде двух пентапептидов, отличающихся только С-концевой аминокислотой, подтвердили Г. Симантов и С. Снейдер [121]. Пептиды были названы Met- и Leu-энкефалинами. Оказалось, что последовательность Met-энкефалина содержится в структуре аденогипофизарного пептида β -липотропина, имеющего последовательность из 91 аминокислотного остатка. Нейропептиды с такой последовательностью ранее были обнаружены и идентифицированы в ткани гипофиза нескольких видов животных С. Ли [122] и С. Ли и Д. Чангом [123]. Было известно, что β -липотропин обладает умеренной жиромобилизующей и меланоцитстимулирующей активностью. Однако до этого никто не отмечал связи его с опиатными рецепторами и не приписывал ему опиоидной активности; β -липотропин образуется из прегормонального белка аденогипофиза, в состав которого входит также адренокортикотропный гормон (АКТГ).

Met- и Leu-энкефалины были первыми и простейшими эндогенными представителями особого класса биологически активных веществ – нейромедиаторов (нейротрансмиттеров) и нейромодуляторов, участвующих в регуляции основных висцеральных (внутренних) систем организма. Вслед за этим почти сразу же последовало открытие ряда других нейрогормонов, представляющих собой более высокомолекулярные пептиды, на N-концах которых находится Met- или Leu-энкефалиновая последовательность. Почти одновременно в 1976 г. Б. Кох и соавт. [124], А. Голдштейн [125], Л. Граф и соавт. [126] и Г. Тешемахер и соавт. [127] обнаружили несколько пептидных опиоподобных по своему действию веществ, названных эндорфинами. Они также оказались фрагментами β -липотропина. Вскоре были выделены и синтезированы гексадека- и гептадекапептидные α - и γ -эндорфины [128–131], входящие в β -эндорфин, состоящий из 31 аминокислотного остатка и являющийся, в свою очередь, С-концевой частью β -липотропина (61–91). Последним был выделен нонадекапептидный участок β -эндорфина, названный δ -эндорфином [132, 133] (рис. III. 23).

Начатые вслед за открытием энкефалинов и эндорфинов тщательные и систематические поиски привели к обнаружению новых эндогенных пептидов, сходных по своему действию с известными экзогенными психотропными препаратами. Этому способствовало совершенствование методов экстрагирования, хроматографии, иммунологического и радиоиммунологического тестирования. В результате были выделены и идентифицированы динорфин, α - и β -неоэндорфины, представляющие собой Leu-энкефалины с дополнительными последовательностями аминокислотных остатков на С-конце, и ряд других нейропептидов.

Подлинно революционизирующее воздействие на эти исследования оказали методы генной инженерии. С их помощью были установлены пути

биосинтеза лигандов опиатных рецепторов, получены ДНК-копии информационных РНК, кодирующие предшественники β -эндорфина, многократно повторяющихся Met- и Leu-энкефалинов и β -неоэндорфина (динорфина); выделены также из хромосомы их гены [134–137]. Установлено, что в гаплоидном геноме млекопитающих существуют только единичные гены, кодирующие предшественников упомянутых гормонов, хотя известно, что существуют гормоны, для которых имеется несколько единичных генов. Клонирование и изучение строения генов пептидных гормонов позволили получить общее представление о предшественниках важнейших опиатных лигандов. Исследования в этом направлении продолжают быстро развиваться и приводят к открытию в семействе пептидных гормонов эндокринной системы все новых соединений [138–140].

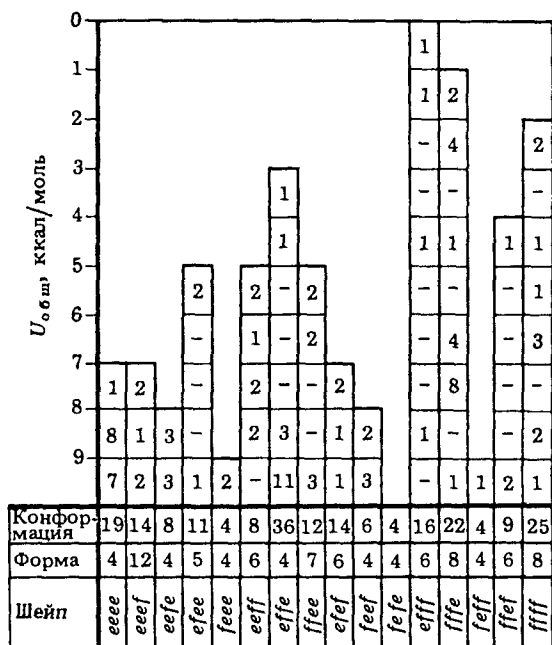
Прогресс в области синтеза нейропептидов и их аналогов в короткий срок создал совершенно новую основу для изучения их функций. Вначале преимущественное внимание уделялось исследованию анальгетического эффекта гормонов и их влияния на психический и неврологический статус организма [141]. Было показано, что энкефалины и эндорфины, помимо обезболивающего действия, обладают также эйфоригенными и подкрепляющими свойствами, а также проявляют ярко выраженный эффект наркотического антагониста налаксона при хронической шизофрении и хронических психозах [142–147]. В последнее время появились сообщения, указывающие на их участие в регуляции многих висцеральных систем организма, а именно обменных процессов, системы пищеварения, функции поджелудочной железы и гипотензивном воздействии на сердечно-сосудистую систему [148]. Широкий спектр биологической активности обеспечивается многочисленностью нейрогормонов в организме и полифункциональностью каждого из них. Функциональные спектры известных в настоящее время лигандов опиатных рецепторов часто перекрываются, тем не менее каждый из них имеет свою специфику. Однако полная ясность в этом вопросе, как и детальная количественная информация, пока отсутствуют. Полифункциональность энкефалинов и эндорфинов может свидетельствовать о конформационной лабильности молекул, необходимой для комплементарной подстройки их пространственных структур к активным центрам различных рецепторов [29, 149–152]. В то же время имеющееся сходство в характере действия энкефалинов и эндорфинов указывает на возможную близость конформаций общих в ряду этих молекул структурных элементов [153]. В частности, при исследовании анальгетической активности и ассоциирующей способности различных эндорфинов была установлена решающая роль N-концевых ароматических аминокислот Tyr¹ и Phe⁴ в активации опиатных рецепторов [133]. Формируется представление о том, что одинаковый у всех эндорфинов пентапептидный Met-энкефалиновый участок ответствен за реализацию многих функций, а количественный эффект и его продолжительность зависят от длины последующей пептидной цепи [124, 133, 154, 155]. Так, длительность анальгезии заметно и систематически снижается в ряду β -, δ -, γ -, α -эндорфинов и Met-энкефалина; действие β -эндорфина по сравнению с морфином значительно продолжительнее и для того же эффекта требует в десятки раз меньших доз [125, 156].

В 1980-е годы изучение пространственного строения и конформационных свойств опийных лигандов, особенно Met- и Leu-энкефалинов и β -эндорфина, становится целью многочисленных экспериментальных исследований, а энкефалинов – также и теоретических, расчетных работ. Имеющиеся в литературе данные рассматриваются в ходе обсуждения излагаемых здесь результатов конформационного анализа этих соединений, проведенного автором данной монографии и соавт. [157–164].

11.1. ЭНКЕФАЛИНЫ

Последовательности Met- и Leu-энкефалинов (см. рис. III. 23) содержат по три аминокислотных остатка с мощными и достаточно лабильными боковыми цепями, число атомов в которых превышает основную цепь, в связи с чем стабилизирующие взаимодействия боковых цепей между собой и с элементами основной цепи должны играть доминирующую роль в структурной организации обоих пентапептидов. Имея в виду это обстоятельство, большое внимание в конформационном анализе энкефалинов было уделено путем варьирования всех возможных конформационных состояний остатков поиску таких стерических ситуаций, которые обеспечивали бы сближенность боковых цепей Tyr¹, Phe⁴, Met⁵ (Leu⁵) и их эффективные взаимодействия в пределах дозволенных низкоэнергетических форм основной цепи. Поскольку последовательности обеих молекул отличаются только С-концевыми остатками, рассмотрим лишь результаты анализа Met-энкефалина. Сопоставляемые с ними данные о пространственном Leu-энкефалина получены аналогичным образом и независимо.

Набор начальных структурных вариантов Met-энкефалина формировался исходя из геометрии оптимальных конформаций отдельных аминокислотных остатков, известных из расчета соответствующих молекул метиламидов N-ацетил- α -аминокислот и оптимальных конформаций предварительно рассчитанного нами дипептида Phe⁴–Met⁵. Всего было получено 202 исходных конформационных состояния с 92 различными формами основной цепи, принадлежащими 16 шейпам, т.е. всем возможным в самом общем случае для пентапептида. На рис. III.24 представлено энергетическое распределение конформаций, полученных после минимизации энергии при вариации двугранных углов ϕ , ψ , ω и χ всех остатков. Из приведенной гистограммы следует, что оптимальные конформации различных форм и шейпов основной цепи, образованные из самых выгодных состояний остатков, существенно отличаются по энергии. Дифференциация оптимальных структур Met-энкефалина имеет место не только по шейпам, но и по формам основной цепи и конформационным состояниям. Предпочтительность для данной последовательности структур со свернутой основной цепью по сравнению с развернутой достаточно очевидна, поскольку у свободной молекулы только в этом случае сближенными оказываются боковые цепи Tyr¹ и Phe⁴, Met⁵. Шейпы пептидного остова *efff*, *fffe*, *ffff*, *effe* и *ffef* предоставляют возможность для образования в условиях плотнейшей упаковки стабилизирующих контактов между N- и С-концевыми остатками. Следует отметить, что у последовательности Met-энкефалина, имеющей два смежных остатка Gly, энергетически выгодно



Р и с. III.24. Энергетическое распределение оптимальных конформаций Мет-энкефалина

свертывание основной цепи осуществляется не за счет α -спиральных R-форм остатков, а путем комбинации иных форм, различных у разного типа структур. Так, например, самая лучшая α -спиральная конформация полностью свернутого шейпа *ffff* с формой основной цепи RRRRRR уступает около 6,0 ккал/моль наиболее выгодной конформации этого же шейпа с формой BHRBL.

В табл. III.21 для пяти самых низкоэнергетических конформаций разных типов Мет- и Leu-энкефалинов приведены величины энергетических вкладов в конформационную энергию от дисперсионных, электростатических и торсионных взаимодействий и водородных связей. Таблица интересна тем, что демонстрирует неодинаковую природу стабилизирующих сил у конформаций разных шейпов и, следовательно, указывает на возможность эффективного воздействия внешних факторов на положение конформационного равновесия. Глобальная конформация Мет-энкефалина ($U_{\text{общ}} = 0$ ккал/моль) наиболее компактна, так как имеет минимальную энергию дисперсионных взаимодействий. Следующая за ней конформация шейпа *ffe* ($U_{\text{общ}} = 1,5$ ккал/моль) предпочтительнее по энергии электростатических взаимодействий и водородных связей. Расчет проведен применительно к условиям полярной среды с использованием диэлектрической проницаемости $\epsilon = 10$ и энергии оптимальной водородной связи $U_{\text{вс}} = -1,5$ ккал/моль. При переходе к неполярной среде и гидрофобному окружению уменьшается величина ϵ , увеличивается $U_{\text{вс}}$ и, кроме того, понижается значение внутримолекулярных дисперсионных взаимодействий

Относительная энергия ($U_{\text{общ}}$) и энергетические вклады ван-дер-ваальсовых ($U_{\text{вдв}}$), электростатических ($U_{\text{эл}}$), торсионных ($U_{\text{торс}}$) взаимодействий и водородных связей ($U_{\text{вс}}$) (ккал/моль) у предпочтительных оптимальных конформаций разных шейпов молекул Met- и Leu-энкефалинов

Шейп	Конформация	$U_{\text{общ}}$	$U_{\text{вдв}}$	$U_{\text{вс}}$	$U_{\text{эл}}$	$U_{\text{торс}}$
Met-энкефалин						
<i>efff</i>	B ₂₁₃ BHR ₂₃ B ₂₁₂	0	-18,1	-1,6	1,0	3,8
<i>fffe</i>	B ₂₃₂ LHB ₂₃ R ₂₂₂	1,5	-12,6	-2,8	-1,4	3,5
<i>ffff</i>	B ₂₃₂ HRB ₂₃ L ₃₂₂	2,4	-13,3	-1,6	-1,1	3,5
<i>effe</i>	B ₁₁₃ BHB ₂₁ B ₂₁₂	3,5	-17,2	-0,5	3,8	2,2
<i>ffef</i>	B ₁₁₂ LLB ₂₁ L ₃₂₂	4,1	-11,5	-1,6	-0,6	2,9
Leu-энкефалин						
<i>efff</i>	B ₂₁₃ BHR ₂₃ B ₂₁	0	-19,4	-1,6	1,0	3,7
<i>fffe</i>	B ₂₃₂ LHB ₂₃ R ₂₁	1,9	-13,5	-2,8	-1,6	3,3
<i>ffff</i>	B ₂₃₂ HRB ₂₃ L ₁₃	3,0	-13,2	-1,6	-1,7	3,1
<i>effe</i>	B ₁₁₃ BHB ₂₁ B ₂₁	2,3	-19,8	-0,5	3,5	2,6
<i>ffef</i>	B ₁₁₂ LLB ₂₁ L ₃₁	4,5	-13,5	-1,6	-0,1	3,3

в стабилизации структуры. Так, при $\epsilon = 4$ и $U_{\text{вс}} = 3,0$ ккал/моль положение конформационного равновесия смещается в сторону структур шейпов *fffe* и *ffff*, которые становятся предпочтительнее *efff* на 3,0 и 1,0 ккал/моль соответственно. Таким образом, расчет приводит к заключению о мобильности структурной организации молекулы Met-энкефалина, обусловленной альтернирующим характером внутримолекулярных взаимодействий. Изменение внешних условий может приводить к перераспределению конформаций в шкале энергии. Следует, однако, подчеркнуть, что при этом никаких новых конформаций в наборе низкоэнергетических состояний не возникает. Расчет показал, что структурные варианты, существенно уступающие лучшим конформациям по величинам $U_{\text{общ}}$, проигрывают последним также по энергии всех видов взаимодействий. Поэтому вариация внешних условий не может сместить положение равновесия в их сторону и сделать актуальными в биологическом акте; важное для функционирования пептида перераспределение имеет место только в пределах набора низкоэнергетических конформаций.

Результаты конформационного анализа Leu-энкефалина очень близки расчетным данным Met-энкефалина. Об этом свидетельствуют данные табл. III.21, в которой сопоставлены энергетические характеристики лучших структур двух молекул. При замене остатка Met⁵ на Leu⁵ наблюдается незначительное повышение энергии конформаций типа *ffff* и понижение энергии конформаций *effe*, что должно привести к небольшому различию в положении конформационного равновесия пентапептидов в полярных средах. Результаты конформационного анализа синтетических аналогов энкефалинов рассмотрены в гл. 17.

Сопоставим рассмотренные результаты с имеющимися эксперименталь-

ными данными о пространственном строении энкефалинов и результатами теоретического конформационного анализа других авторов. В первом структурном исследовании Met-энкефалина методом ^1H -ЯМР Б. Роджес и соавт. [153, 165] пришли к заключению, что в растворе диметилсульфоксида (DMSO) предпочтительная конформация молекулы имеет свернутую в виде так называемого β_1 -изгиба форму основной цепи со сближенными концевыми группами $^+\text{NH}_3$ и COO^- и водородной связью между NH-группой Met⁵ и CO-группой Gly². В предложенной структуре большой конформационной свободой обладают дипептидный участок Tyr¹-Gly² и боковые цепи Tyr¹, Phe⁴, Met⁵, которые ориентированы в среду и не взаимодействуют друг с другом и с пептидным остовом. Существенный довод в пользу такой структуры авторы видят в близком морфину расположении группы $^+\text{NH}_3$ и фенольного кольца. Стремление соблюсти структурное подобие нейропептида и морфина привело А. Бредбэри и соавт. [166] к другой молекулярной модели Met-энкефалина.

Одновременно с авторами работ [153, 165] и также методом протонного ядерного резонанса Met-энкефалин был исследован Ч. Джонсом и соавт. [149]. В работе не исключается наличие в растворах DMSO и H₂O конформаций разных форм, но доминирующей считается свернутая структура, аналогичная постулированной в [167]. Здесь, однако, предполагается, что при этой форме пептидного остова каждая из боковых цепей Tyr¹, Phe⁴ и Met⁵ представлена, причем со значительным вкладом, тремя вращательными изомерами. Следовательно, у молекулы Met-энкефалина возможна реализация 27 приблизительно равновероятных конформаций, имеющих одну форму основной цепи. Разница в энергии ротамеров близка комнатному значению кТ, а скорость их конверсии – 10^{-10} – 10^{-11} с. В работе [149], как и в [153, 165], отмечается близость спектров ЯМР энкефалина в растворах DMSO и H₂O.

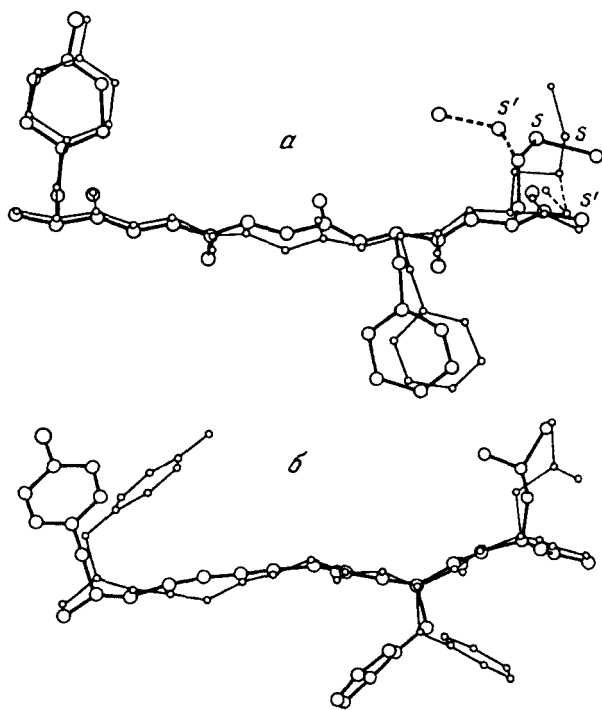
Более детально конформационные возможности молекул Met- и Leu-энкефалинов были изучены М. Халедом и соавт. [168] методами ^1H - и ^{13}C -ЯМР, УФ-, КД-спектроскопии при различных температурах в большом наборе растворителей и широком интервале концентраций. Показано, что спектральные свойства, используемые для структурной идентификации пентапептидов, существенно зависят от температуры, природы растворителя и концентрации. Все отмеченные в спектрах изменения объяснены реализацией в растворе двух конформационных состояний энкефалинов, отвечающих свободной и ассоциированной формам молекул. Пептидная цепь мономера представляет собой β_1 -изгиб с остатками Gly³ и Phe⁴ в центре поворота цепи и водородной связью между NH Met⁵ и CO Gly². Такая модель согласуется с предположениями авторов работ [149, 153, 165] и противоречит [166, 169, 170]. Новыми элементами модели явились две дополнительные водородные связи (Gly³) NH...OC (Tyr¹) и (Tyr¹) OH...OC (Gly³), закрепляющие основную и боковую цепи тирозина. Кроме того, N-конец молекулы стабилизирован эффективными взаимодействиями фенольного кольца, нависающего над свернутой основной цепью. В работах [149, 153, 165] остаток Tyr¹, напротив, предполагается свободным, что обосновывается опытными данными и физиологической целесообразностью. В концентрированных растворах молекулы энкефалина димери-

зованы, образуя антипараллельную β -структуру с соответствующей системой водородных связей.

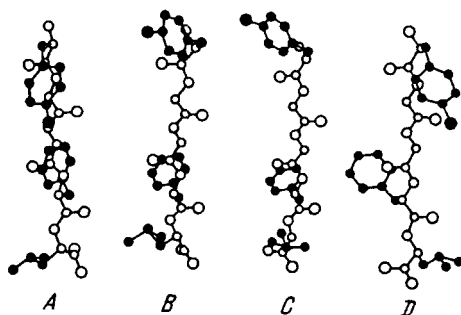
М. Спиртс и соавт. [151], исследовав УФ- и КД-спектры Met-энкефалина в растворе при температурах 5–50°C и значениях pH 1–12, пришли к заключению о чрезвычайной внутренней подвижности молекулы, для которой характерен представительный набор равновероятных и легко переходящих друг в друга конформаций. Выбор функциональной структуры происходит, очевидно, в процессе взаимодействия энкефалина с рецепторным центром. Вывод о значительной подвижности всех боковых цепей и пептидного скелета и быстром изменении конформационного состояния Met-энкефалина был сделан также в работе Р. Деслортерса и соавт. [171] на основе данных ^{13}C -ЯМР-спектров. Заключение в работах [151, 171] противоречит, однако, результатам исследования внутримолекулярной подвижности нейропептида, проведенного релаксационным методом ЯМР "вращающегося каркаса" [172]. И. Нигашияма и соавт. [173], изучив ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектры Met-энкефалина с использованием эффекта Оверхаузера, пришли к выводу, что опытные данные не подтверждают предположения о преимущественной структуре с β -изгибом и внутримолекулярными водородными связями. В работе [174] на основе данных ^1H -ЯМР авторы утверждают, что наиболее предпочтительными для Met-энкефалина в водной среде являются конформации, вытянутые вдоль пептидных связей. Авторы другой работы, также использовавшие метод ^1H -ЯМР [175], пришли к выводу, что наиболее предпочтительной структурой Leu-энкефалина в органических средах является свернутая форма с $4 \rightarrow 1$ β -изгибом, а в мицеллярных системах ($\text{SDS}/\text{H}_2\text{O}$) – свернутая форма с $5 \rightarrow 2$ β -изгибом. Наличием этих двух форм объяснено эффективное взаимодействие Leu-энкефалина с двумя различными опиоидными рецепторами (μ - и δ -).

Met- и Leu-энкефалины являются теми, пока еще редкими линейными олигопептидами, которые удалось закристаллизовать и исследовать с помощью рентгеноструктурного анализа. Впервые это было сделано Г. Смитом и соавт. [52, 53, 176]. Согласно полученным данным, кристаллическая структура Met-энкефалина построена из димеров, образующих антипараллельные β -складчатые листы. Молекулы димера имеют одинаковые конформации основных цепей, близкие конформации боковых цепей остатков Tyr и Phe, и неупорядоченные, отличающиеся друг от друга состояния боковых цепей остатка Met (рис. III.25,а). Кристаллическая решетка Leu-энкефалина изоморфна решетке Met-энкефалина и также состоит из димеров, молекулы которых отличаются ориентациями боковых цепей Tyr, Phe и Leu (рис. III.25,б). В кристаллах Leu-энкефалина, исследованных позднее И. Карле и соавт. [54, 55], идентифицированы четыре разных конформера, имеющих одинаковое пространственное строение основных цепей и различное положение всех боковых цепей (рис. III.26). В других рентгеноструктурных исследованиях кристаллических энкефалинов [177–179] наряду с развернутыми структурами были обнаружены также свернутые конформации молекул.

Таким образом, данные рентгеноструктурного анализа, полученные в нескольких лабораториях, существенно отличаются от рассмотренных



Р и с. III.25. Наложение двух кристаллографически независимых молекул Мет-энкефалина (а) и Леу-энкефалина (б) [158]



Р и с. III.26. Четыре конформации молекулы Леу-энкефалина (А–D), образующие кристаллическую решетку [159]

ранее результатов физико-химических исследований тех же пептидов. Если первые свидетельствуют о реализации в кристалле главным образом конформаций энкефалинов с полностью развернутыми формами основных цепей, то вторые, несмотря на всю противоречивость их интерпретации, — о доминировании в растворе свернутых форм молекул. Данный факт легко объяснить, если воспользоваться результатами теоретического конформа-

ционного анализа пентапептидных гормонов [157]. Расчет показал, что у свободных молекул энкефалинов предпочтительность по энергии конформаций со свернутыми формами пентапептидов (см. табл. III.21) обусловлена почти исключительно невалентными взаимодействиями сближенных в этом случае боковых цепей остатков Tyr, Phe и Met (Leu). Лучшая оптимальная конформация молекулы энкефалина с полностью развернутой формой основной цепи (B-B-B-B-B) проигрывает глобальной свернутой конформации (B-B-H-R-B) ~7,5 ккал/моль, причем проигрыш связан только с отсутствием из-за удаленности противоположных концов цепи стабилизирующих контактов между боковыми цепями Tyr и Phe, Met (Leu). Обнаружить β -структурную конформацию в растворе среди многих десятков других более низкоэнергетических оптимальных конформаций не в состоянии ни один физико-химический метод. Совершенно иная ситуация наблюдается в кристалле, где потеря энергии внутримолекулярных взаимодействий между остатками может быть с избытком компенсирована выигрышем энергии невалентных взаимодействий той же природы между молекулами. В результате относительная энергия всех свернутых форм резко возрастает, а развернутых – уменьшится и одна из них станет глобальной. Смещение под действием внешнего фактора положения конформационного равновесия является распространенным явлением. Оно имеет место не только при изменении агрегатного состояния, но, что более важно, при гормон-рецепторных, фермент-субстратных и многих других межмолекулярных взаимодействиях олигопептидов, несущих функциональную нагрузку.

Молекулы энкефалина являлись объектами многочисленных теоретических конформационных исследований. Впервые расчет структуры Met-энкефалина был проведен в 1977 г. Дж. Де-Коэном и соавт. [167, 180]. На основе анализа 400 структурных вариантов молекулы, сформированных путем комбинации конформационных состояний свободных остатков, отвечающих минимумам на соответствующих картах ϕ - ψ , выделены 15 конформаций с относительной энергией 0–3,0 ккал/моль. Они имеют как свернутые, так и полностью развернутые формы основной цепи, причем вторые являются более предпочтительными. В наборе низкоэнергетических конформаций на предпоследнем месте оказалась структура с β_1 -изгибом, предложенная ранее на основе данных ЯМР [149, 153]. Ввиду крайне упрощенной методики расчета, исключающей реальную оценку межостаточных взаимодействий прежде всего боковых цепей и их пространственной ориентации, выводы работ [52, 167] трудно считать достаточно обоснованными. Использованный неконтролируемый подход к выбору исходных конформационных состояний остатков и отсутствие минимизации энергии по углам внутреннего вращения не гарантируют от пропуска действительно низкоэнергетических структур Met-энкефалина и ошибочного конформационного распределения по величинам энергии.

Более тщательный теоретический анализ Met-энкефалина выполнен У. Изогаи и соавт. [181]. Найденная глобальная конформация молекулы имеет свернутую форму с β_2 -изгибом и центральными остатками Gly³-Phe⁴. Она стабилизирована невалентными взаимодействиями элементов основной цепи и водородной связью между группами OH тиро-

зиновой боковой цепи и CO Gly³ или Phe⁴. Боковые цепи остатков метионина и фенилаланина ориентированы в среду и конформационно свободны. Аналогичную форму имеют еще шесть конформаций с энергией 0,2–8,0 ккал/моль, отличающихся положением боковых цепей. Расчет авторов работы [181] в основном согласуется со спектральными данными ЯМР [149, 153, 165, 168], подтверждающая предположение о предпочтительности для молекулы Мет-энкефалина в разбавленном растворе конформаций одной формы основной цепи.

Геометрия глобальной структуры, полученной в исследовании [181], полностью совпадает с найденной нами независимо самой выгодной конформацией молекулы (табл. III.21) не только по шейпу пептидного скелета (*efff*), но и по форме и ориентациям боковых цепей (B₂₁₃BHR₂₃B₂₁₂). Более того, имеется удовлетворительное количественное совпадение двугранных углов ϕ , ψ , ω и χ всех остатков (средний разброс не превышает 8°). Рассчитанные в этой работе структурные варианты иных типов имеют существенно более высокую энергию. Так, относительная энергия лучшей конформации типа *effe* (в нашей классификации), непосредственно следующей за глобальной, составляет 5,4 ккал/моль. Найденная нами количественно точно такая же в отношении всех деталей конформация имеет энергию 3,5 ккал/моль. Различие не так существенно, однако важно другое. Согласно нашему расчету, между конформациями шейпов *efff* и *effe* ($U_{\text{общ}} = 0$ и 3,5 ккал/моль) находятся конформации еще двух типов *fffe* и *ffff*, лучшие из которых имеют энергию 1,5 и 2,4 ккал/моль. По данным расчета У. Изогаи и соавт. [181], самые низкоэнергетические структуры этих типов характеризуются значениями $U_{\text{общ}}$ соответственно около 6,0 и 11,0 ккал/моль. Причина состоит в ошибочной стратегии анализа. Полностью свернутая структура (*ffff*) представлена в рассмотренном наборе лишь α -спиральной формой, которая и по нашим данным действительно невыгодна для последовательности Мет-энкефалина. Другие же формы спирального типа, оказавшиеся в данном случае более предпочтительными, не проанализированы. Из всех возможных вариантов шейпа *fffe* рассмотрены структуры только с формой основной цепи BHRBB, а самые низкоэнергетические структуры этого типа, имеющие, по нашим данным, форму BLHBR, во внимание не были приняты. Таким образом, вывод авторов [181] о доминирующем содержании в растворе конформаций *efff* Мет-энкефалина не отражает реальную ситуацию, а является следствием значительных пропусков в наборе исходных конформационных состояний.

К интересному заключению, противоречащему начинающему складываться представлению об актуальной для проявления опиоидной активности конформации Мет-энкефалина, пришел в результате теоретического анализа природной молекулы и ее аналогов Ф. Момани [182]. Биологические испытания [D-Ala²]- и [D-Ala³]-аналогов Мет-энкефалина показали, что активность первого соединения в несколько раз выше, чем у природного нейропептида, а у второго – практически отсутствует [183–185]. Если установленная экспериментально [129, 133, 145, 168] и рассчитанная априорно [181] глобальная конформация шейпа *efff* действительно ответственна за взаимодействие с опиатным рецептором, то замена Gly²

на $D\text{-Ala}^2$, учитывая данные биологических испытаний, не должна привести к существенному изменению ее геометрии и величины относительной энергии. Расчет Момани, однако, показал, что это не так. Глобальной у $[D\text{-Ala}^2]\text{-Met-энкефалина}$ является конформация другого типа, а именно $fffe$, а конформация $efff$, самая выгодная для природного пентапептида, обладает заметно большей энергией. В свете таких данных, казалось бы, оправданным выглядило предположение о том, что конформация типа $efff$ не имеет отношения к активному центру опиатного рецептора. Но это только на первый взгляд. Поскольку в работе У. Изогаи и соавт. [181], на основе результатов которой было проведено исследование [182], не рассматривались все возможные типы структур, а у каждого типа – все возможные формы основной цепи, то вывод Момани лишен строгого обоснования. Самая предпочтительная конформация шейпа $efff$ могла иметь не BBHRB-форму, а, например, не рассмотренную в [181] форму RLHRB, также не противоречащую известным опытным данным. При замене Gly^2 на $D\text{-Ala}^2$ она осталась бы глобальной у $[D\text{-Ala}^2]\text{-Met-энкефалина}$, а при той же замене Gly^3 стала бы нереальной для $[D\text{-Ala}^3]\text{-аналога}$. В этом случае для объяснения результатов биологических испытаний пришлось бы сделать вывод, прямо противоположный уже сделанному в [182]. Что же касается конкретных результатов расчета Момани, то они очевидны. В рассматриваемой конформации Met-энкефалина остаток Gly^2 находится в состоянии В. Для остатка $D\text{-Ala}$ оно крайне невыгодно, поскольку энергетически эквивалентно состоянию Н для $L\text{-Ala}$, которое, как известно, практически не обнаруживается в структурах пептидов и белков у аминокислотных остатков, за исключением глицина. В структуре же шейпа $fffe$, следующей за $efff$ и имеющей, согласно нашим данным, форму BLHRB (см. табл. III.21), замена Gly^2 на $D\text{-Ala}^2$ не ведет к повышению энергии, и поэтому она становится глобальной.

Упрощенный подход к конформационному анализу Met-энкефалина характерен также для работы Ю. Балодиса и соавт. [186]. В ней рассмотрены структурные варианты лишь 21 формы основной цепи молекулы, что составляет менее четверти вероятных и, следовательно, подлежащих анализу форм пентапептида. Кроме того, каждая из рассмотренных форм представлена ограниченным набором конформационных состояний. В результате вне анализа оказались все варианты с формой основной цепи BBHRB, которую имеет, согласно расчету Изогаи и соавт. [181] и нашим данным (табл. III.21), глобальная конформация Met-энкефалина; не учтены и многие другие низкоэнергетические состояния.

Ш. Ёнеда и соавт. [187] применили метод молекулярной динамики к мономерной и димерной структурам Met-энкефалина. Полностью вытянутая мономерная конформация, выбранная в качестве исходной, переходила по ходу расчетной процедуры в стационарное состояние, представляющее собой свернутые формы с β -изгибом, а вытянутая антипараллельная димерная структура оставалась неизменной. Сделан вывод, что найденные формы мономера и димера являются основными конформациями энкефалина, сосуществующими в водном растворе. Расчет прост-

пространственного строения молекулы Мет-энкефалина провели также З. Ли и Г. Шерага [188]. Однако цель этой работы выходит далеко за рамки исследования конформационных возможностей пептидного гормона, сравнительно простого по своему размеру и аминокислотному составу. Энкефалин использован лишь в качестве примера, который должен продемонстрировать возможности предложенного авторами метода поиска самых глубоких, отвечающих нативным глобальным конформациям молекул, энергетических минимумов среди множества так называемых локальных минимумов на многомерных потенциальных поверхностях пептидов и белков. В связи с этим затрагиваются некоторые аспекты проблемы свертывания и структурной организации природных полипептидов, что представляет общий интерес, в связи с чем остановимся на публикации Ли и Шераги, уже упоминавшейся в разделе 7.3, более подробно.

Подход к идентификации глобального минимума, названного авторами [188] методом Монте Карло-минимизации, состоит из следующих трех этапов: а) процедуры Монте Карло, заключающейся в беспорядочном выборе начальной конформации из огромного количества потенциально равновероятных, б) оптимизации этой конформации при произвольном изменении от -180 до 180°C случайно отобранного двугранного угла вращения (ϕ , ψ , ω или χ) и в) сопоставлении энергии проминимизированной конформации с результатами предшествующего расчета данной серии. Далее совершается переход к следующей итерации с повторной минимизацией той же начальной конформации, но при флуктуации в аналогичных пределах новой переменной, также случайно выбранной. В расчете Мет-энкефалина серия заканчивалась после 10000 итераций, занимавших от 4 до 10 ч машинного времени IBM-3090. Всего было проведено 17 беспорядочно-поисковых процедур, стартовавших с разных конформационных состояний. В каждом случае выбор самой низкоэнергетической структуры производился после сопоставления результатов анализа 10000 локальных минимумов. Из 17 генераций в 12 предпочтительной по энергии оказывалась одна и та же конформация, которая и была признана глобальной для Мет-энкефалина. В пяти генерациях, т.е. в $\sim 30\%$ рассмотренных вариантов, лучшими оказались другие конформации, энергия которых, по крайней мере, на 2 ккал/моль превышала энергию глобальной формы.

Можно ли выводы Ли и Шераги в отношении найденной структуры Мет-энкефалина считать объективными? Является ли метод Монте Карло-минимизации перспективным для расчета нативных конформаций белков и механизмов их сборки? Адекватен ли он в принципе реальному процессу свертывания белковой цепи? У самих авторов на этот счет нет сомнений. Оценивая в заключении статьи возможности предложенной процедуры, они отмечают: "Применение метода Монте Карло-минимизации к свертыванию олигопептидов не только способствует пониманию физической сущности процесса свертывания белковой цепи, но также может являться эффективным алгоритмом предсказания нативных структур белка. ...Более того, поскольку метод Монте Карло-минимизации позволяет проводить исследования крупномасштабных изменений (и белковое свертывание является лишь одним таким примером), то он может быть весьма полез-

ным в изучении свойств и структурно-функциональных зависимостей белков" [188. С. 6615].

Перед тем, как ответить на поставленные вопросы и оценить в какой мере оправдан оптимизм Ли и Шераги в отношении перспективности предложенного ими метода, обратимся к результатам конформационного анализа Мет-энкефалина. Как полагают авторы, общее количество локальных минимумов на потенциальной поверхности пентапептида и, следовательно, число потенциально равновероятных структурных вариантов молекулы, составленных только из низкоэнергетических конформационных состояний свободных аминокислотных остатков, равно 10^{11} . Из них было проанализировано $17 \cdot 10^4$ структурных вариантов, т.е. 0,0002% от общего количества, на что затрачено ~ 100 ч машинного времени, т.е. ~ 4 суток. Непрерывный расчет всех минимумов занял бы $\sim 2 \cdot 10^6$ суток или $\sim 5,5 \cdot 10^3$ лет. Из столь простых выкладок, основанных на приведенных в работе данных, нельзя не прийти к следующим заключениям. Во-первых, трудно признать оправданным отнесение к глобальной одной из конформаций, полученной при рассмотрении крайне малой части исходных приближений (0,0002%) и фактическом игнорировании результатов 5 из 17 проведенных серий итераций с изменением при каждой итерации только одной переменной. Таким образом, исследование пространственного строения Мет-энкефалина не выявило энергетически самой выгодной структуры молекулы и не привело к достижению поставленной авторами конкретной цели. В этом, однако, нет большой беды. Знание у лабильного пентапептида лишь единственной структуры, пусть даже обладающей наименьшей энергией, вряд ли может представить значительный интерес. Несравненно большую ценность как в чисто научном, так и прикладном отношении имела бы количественная информация о всем наборе низкоэнергетических конформаций гормона. Во-вторых, метод Монте Карло-минимизации не может быть использован в конформационном анализе даже коротких олигопептидов, по крайней мере, по двум причинам: из-за множества исходных для минимизации приближений (у Мет-энкефалина их 10^{11}) и неудовлетворительности самой процедуры оптимизации (вариация одной переменной при фиксированных значениях остальных).

Неэффективность рассматриваемого подхода, проявляющаяся уже на уровне конформационного анализа пентапептида, предопределяет ответ на второй поставленный выше вопрос, который касается перспективности процедуры Монте Карло в предсказании нативных конформаций более сложных аминокислотных последовательностей. Практически бесконечное количество минимумов на потенциальной поверхности любого белка не оставляет надежды на решение проблемы мультиплетности исключительно на стохастической основе. Но, может быть, затруднения здесь не являются принципиальными, и такой подход, если не в состоянии привести к количественному решению, поможет понять "физическую сущность свертывания белковой цепи"? Как полагают Ли и Шерага, метод Монте Карло-минимизации адекватен действительному процессу сборки белка, который, по их мнению, является Марковским процессом. Так, они пишут: "Монте Карло-минимизация представляет собой одну из многих возможных процедур, реализующих гипотезу Маркова путем генерации с Больц-

мановскими вероятностями перехода Марковского процесса, воспроизводящего естественное свертывание белковой цепи" [188, С. 6614]. Если отмечаемая аналогия между процедурой Монте Карло и Марковским процессом действительно имеет место, то отнесение сборки белка к Марковскому процессу лишено основания. Известно, что Марковским называется случайный процесс без последствий. Он служит моделью для таких процессов, как, например, распад радиоактивного вещества, рост популяции, мутация. Характерная особенность Марковского процесса заключается в том, что информация о прошлом поведении системы не влияет на распределение вероятностей ее будущего развития. Если бы свертывание белковой цепи удовлетворяло этому условию, то она никогда не смогла бы перейти из состояния флуктуирующего клубка в определенную трехмерную структуру. Сборка полимерной природной аминокислотной последовательности не является Марковским, чисто статистическим процессом, описываемым равновесной термодинамикой, а статистико-детерминистическим неравновесным процессом, суть которого состоит во взаимообусловленности макроскопических и микроскопических свойств, описываемых только нелинейной неравновесной термодинамикой (см. разд. 2.1). Он может развиваться исключительно в силу того, что прошлое системы предопределяет ее будущее.

Позднее Д. Риполл и Г. Шерага [189, 190] предложили еще один метод определения глобальной трехмерной структуры, который, по мнению его авторов, позволяет, как и рассмотренный выше метод З. Ли и Г. Шераги [188], моделировать процесс перехода белковой цепи от денатурированного состояния к нативной конформации. Новый метод – это еще одна попытка решить проблему мультиплетности минимумов функции потенциальной энергии с помощью процедуры Монте Карло-минимизации, в данном случае дополненной электростатической стимуляцией. Предполагается, что именно такой вид невалентных взаимодействий направляет процесс свертывания белка через локальные минимумы по энергетически наиболее предпочтительному пути. Изменение в методологии, однако, не может устранить или смягчить принципиальной несостоятельности чисто статистического подхода к изучению явления, в значительной мере обусловленного детерминистической компонентой его двойственной природы. Надежда на успех здесь столь же призрачна, как при попытке количественно описать стохастический процесс (например, броуновское движение, диффузию, теплообмен) методами классической физики или квантовой механики. Что касается дополнительного стимулирования Монте Карло-минимизации, то следует заметить, что энергия электростатических взаимодействий по сравнению с энергией всех других видов невалентных взаимодействий менее чувствительна к расстоянию между валентно-несвязанными атомами и менее всего зависима от конформационного состояния молекулы.

Методы поиска глобальных конформаций пептидов и белков, основанные на процедуре Монте Карло, помимо Шераги и соавт. [188–190], были предложены рядом других авторов [191–197], которые также в качестве тестовых объектов использовали, как правило, Met- и Leu-энкефалины. Эти исследования не внесли что-либо принципиально нового ни в

решение проблемы мультиплетности минимумов, ни в представление о структурной организации пентапептидного гормона. К ним в полной мере относятся все те заключения общего порядка и оценки конкретных результатов конформационного анализа, которые были сделаны при рассмотрении работ [188–190].

Заканчивая обсуждение теоретических и экспериментальных данных о конформационных возможностях молекул энкефалинов, по-видимому, можно отметить, что в настоящее время нет еще единого мнения о пространственном строении простейших природных нейропептидов, количестве предпочтительных состояний, их энергии и геометрии. Не только не установлена связь между структурой и функцией, но не ясны некоторые принципиальные моменты подхода к достижению этой цели. Тем не менее, имеющийся материал о структуре энкефалинов указывает на наличие у них большой конформационной свободы и возможности реализации структур различных шейпов, а в пределах одного шейпа – нескольких форм основной цепи.

Каковы же ближайшие перспективы? Можно ли, продолжая изучение Met- и Leu-энкефалинов и других пептидных гормонов в том же плане, получить со временем полную и объективную количественную информацию об их структурной организации и зависимости между структурой и функцией? Чтобы ответить на этот вопрос, предположим, что такой информацией мы уже располагаем, и попытаемся представить, что она могла бы дать для понимания структурно-функциональной организации энкефалинов и описания механизмов их многочисленных функций. Как можно было бы логически связать данные, например, о 10 низкоэнергетических конформациях каждого нейропептида с приблизительно таким же количеством его функций? Очевидно, установить прямую связь при неизвестных пространственных структурах рецепторов не представляется возможным. Число возможных комбинаций, особенно если учесть существование нескольких рецепторов (μ , σ , δ) для осуществления только одной опиатной функции энкефалина, слишком велико, чтобы надеяться даже в гипотетическом идеальном случае найти искомые соотношения интуитивным путем. Многие полагают, что к достижению цели ведет косвенный путь, заключающийся в привлечении синтетических аналогов, изучении их структуры и биологической активности. В принципе подобный подход вот уже не одно столетие применяется в поиске фармацевтических препаратов. Однако такой путь в его сегодняшнем состоянии не только длителен, сложен и дорогостоящ, но, главное, он не может привести к окончательному решению проблемы. Замена аминокислот в природной последовательности, укорочение цепи или добавление новых остатков. иными словами, любая модификация химического строения природного пептида, неизбежно сопровождается изменением конформационных возможностей молекулы и одновременно затрагивает склонные к специфическому взаимодействию с рецептором остатки, что сказывается на характере внутри- и межмолекулярных взаимодействий, в том числе на устойчивости аналогов к действию протеиназ. Для учета последствий химической модификации на характер внутримолекулярных взаимодействий можно использовать теоретический конформационный анализ и методы кванто-

вой химии Количественная же оценка изменений при межмолекулярных взаимодействиях, т.е. конкретная реализация известных конформационных возможностей модифицированного пептида, требует как минимум знания структуры рецептора. О сложности возникшей здесь задачи убедительно свидетельствует богатый опыт, накопленный за последние десятилетия энзимологией, где проблема идентификации лиганда и рецептора решается несравненно проще. При этом условии и даже при известной геометрии субстрата и активного центра фермента, а также знании чисто химических аспектов фермент-субстратных взаимодействий количественное описание каталитического акта как взаимообусловленного на всех своих стадиях и спонтанно протекающего процесса наталкивается на большие трудности и часто не может быть выполнено однозначным образом.

В исследовании взаимодействий полифункциональных гормонов и рецепторов с привлечением синтетических аналогов не исключены ситуации (они не предсказуемы, поскольку выбор аналогов, как правило, случаен), когда наиболее предпочтительная конформация синтетического пептида стерически комплементарна активному центру рецептора, но необходимый комплекс тем не менее не образуется, так как модифицированная последовательность не содержит остатков, необходимых для образования эффективных контактов с функциональными группами рецептора. Возможен, конечно, и прямо противоположный случай, приводящий к тому же результату. Принципиально слабым местом в используемом в настоящее время подходе к установлению зависимости между структурой и функцией пептидов и, в частности, гормонов является то, что он базируется на случайном поиске синтетических аналогов методом проб и ошибок. Поэтому, отдавая должное усилиям в экспериментальном и теоретическом изучении искусственно модифицированных последовательностей энкефалинов, следует сказать, что при существующем интуитивном выборе модельных соединений можно рассчитывать лишь на частный успех. Качественный прогресс здесь можно ожидать только при строго научном, а не случайном подборе аналогов, иными словами, при отходе от метода проб и ошибок к методу, обладающему предсказательными возможностями и доказательной силой. Первая попытка в этом направлении [28, 29] основывается на решении обратной структурной задачи, т.е. на сознательном, целенаправленном конструировании химического строения немногочисленных искусственных аналогов, пространственное строение которых в своей совокупности отвечает набору низкоэнергетических, физиологических активных состояний природного гормона (см. гл. 17). Детально структурно-функциональная организация природных пептидов будет обсуждена в следующем томе издания "Проблема белка". О первых успехах рентгеноструктурного анализа в изучении трехмерных структур рецепторов рассказывается во втором томе издания [98. Гл. 3, 4].

11.2. ЭНДОРФИНЫ

α -Эндорфин. Конформационный анализ молекулы α -эндорфина выполнен путем разбивки его аминокислотной последовательности на отдельные фрагменты и их расчета в порядке, указанном на рис. III.23 В преды-

Таблица III.22

Низкоэнергетические оптимальные конформации молекулы α -эндорфина

Группа конформации	Шейп	Конформация	Конформационная энергия, ккал/моль			
			U _{общ}	U _{вдв}	U _{эл}	U _{торс}
A ₁	eff eeef fffe ffff effe A	fef fee eff fef fef fef eff fef ffe B₂₁₂¹ B² H³ R₂₃⁴ B₂₁₂⁵ R₃₂⁶ R₁₂⁷ R₂₂₁⁸ R₃₁₂₂⁹ R₂₂¹⁰ R₁₂₃¹¹ B₃₂¹² R¹³ B₂₂¹⁴ R₂¹⁵ R₁₃¹⁶	0	-91,6	7,2	13,6
A ₂		B₂₁₂ B H R₂₃ B₂₁₂ R₃₂ R₁₂ R₂₂₁ R₃₁₂₂ R₂₂ R₁₂₃ B₃₂ R B₂₂ B₂ B₃₂	4,4	-89,9	8,9	14,7
A ₃		B₂₁₂ B H R₂₃ B₂₁₂ R₃₂ R₁₂ R₂₂₁ R₃₁₂₂ R₂₂ R₁₂₃ B₃₂ B R₂₁ R₂ R₃₂	9,2	-87,0	11,4	14,1
A ₄		B₂₁₂ B B R₃₁ B₁₂₂ R₁₂ R₁₂ R₂₂₁ R₃₁₂₂ R₂₂ R₁₂₃ B₃₂ R B₂₂ R₂ R₃₂	1,0	-86,8	5,5	11,5
A ₅		B₂₁₂ H R B₂₁ B₂₁₂ R₁₂ R₁₂ R₂₂₁ R₃₁₂₂ R₂₂ R₁₂₃ B₃₂ R B₂₁ R₂ R₃₂	1,7	-85,9	6,3	10,7
A ₆		B₂₃₂ H R B₂₃ L₃₂₂ R₃₂ R₁₂ R₂₂₁ R₃₁₂₂ R₂₂ R₁₂₃ B₃₂ R B₂₂ R₂ B₃₂	4,4	-86,8	7,8	12,7
A ₇		B₂₃₂ H R B₂₃ L₃₂₂ R₃₂ R₁₂ R₂₂₁ R₃₁₂₂ R₂₂ R₁₂₃ B₃₂ B R₂₁ R₂ R₃₂	6,1	-86,0	8,9	12,5
A ₈		B₁₃₃ B H B₁₁ B₂₁₂ R₁₂ R₁₂ R₂₂₁ R₃₁₂₂ R₂₂ R₁₂₃ B₃₂ R B₂₂ R₂ B₃₂	4,7	-87,1	8,9	12,2
A ₉		B₁₃₃ B H B₁₁ B₂₁₂ R₁₂ R₁₂ R₂₂₁ R₃₁₂₂ R₂₂ R₁₂₃ B₃₂ R R₂₁ B₂ R₁₂	6,7	-85,2	9,6	11,5
B ₁	B	fef fee efe ffe eff B₂₁₂ H R R₂₁ R₂₂₂ R₃₂ R₁₂ R₂₂₁ R₃₁₂₂ R₂₂ R₁₂₃ B₃₂ R B₂₂ R₂ R₃₂	3,0	-87,3	8,3	11,3
B ₂		B₂₁₂ H R R₂₁ R₂₂₂ R₃₂ R₁₂ R₂₂₁ R₃₁₂₂ R₂₂ R₁₂₃ B₃₂ R B₂₂ B₂ B₃₂	5,4	-86,9	9,3	12,3
B ₃		B₂₁₂ H R R₂₁ R₂₂₂ R₃₂ R₁₂ R₂₂₁ R₃₁₂₂ R₂₂ R₁₂₃ B₃₂ B R₂₁ B₂ R₃₂	8,8	-83,6	10,6	11,1
B ₄		B₂₁₂ H R R₂₁ R₂₂₂ R₃₂ R₁₂ R₂₂₁ R₃₁₂₂ R₂₂ R₁₂₃ B₃₂ R R₂₁ B₂ R₁₂	9,6	-84,1	10,9	12,1
B ₅		B₂₁₂ H R R₂₁ R₂₂₂ R₃₂ R₁₂ R₂₂₁ R₃₁₂₂ R₂₂ R₁₂₃ B₃₂ B R₂₁ R₂ B₃₂	9,7	-84,1	11,8	11,2
C ₁	C	eff B₂₁₃ H R B₂₁ B₂₁₂ B₁₂ R₁₂ B₂₁₁ R₃₁₂₂ R₂₂ R₁₂₃ B₃₂ B R₂₁ R₂ R₃₂	4,3	-82,3	4,7	11,2
C ₂		efe B₂₁₂ B B B₁₁ B₂₁₂ B₁₂ R₁₂ B₂₁₁ R₃₁₂₂ R₂₂ R₁₂₃ B₃₂ B B R₂₁ B₂ R₃₂	7,2	-81,2	8,5	9,3

B

душем разделе рассмотрены конформационные возможности свободной молекулы Мет-энкефалина с заряженными N- и C-концевыми группами NH_3^+ и COO^- . Поскольку энкефалиновая последовательность аминокислот входит в состав пептидной цепи эндорфинов, был выполнен дополнительный конформационный анализ $\text{Tyr}^1 - \text{Met}^5$ как фрагмента с N-метилованной C-концевой пептидной группой, лишенной отрицательного заряда. Расчет не привел к существенному энергетическому перераспределению полученных для молекулы Мет-энкефалина конформаций (рис. III.24). Остановимся на заключительном этапе расчета α -эндорфина.

В табл. III.22 приведены 16 оптимальных конформаций α -эндорфина, относительная энергия которых не превышает 10 ккал/моль. Они разделены на три группы: А, В и С. Общим элементом в каждой группе является шейп пептидного остова центрального фрагмента $\text{Met}^5 - \text{Pro}^{13}$. Его шейп в группе А (*effffffe*) отличается от шейпа в группе В (*fffffffe*) только дипептидным участком $\text{Met}^5 - \text{Thr}^6$, структура которого в первом случае относится к развернутому типу (*e*), а во втором – к свернутому (*f*). Различия шейпа группы С (*eeffffffe*) более значительны.

Наиболее представительна по числу низкоэнергетических конформаций группа А. В ней находится глобальная структура α -эндорфина (A_1), а также незначительно уступающие ей по энергии структуры A_4 ($U_{\text{общ}} = 1,0$ ккал/моль), A_5 (1,7), A_2 , A_6 (4,4) и A_7 (4,7). Все конформации этой группы в центре, на участке $\text{Thr}^6 - \text{Thr}^{12}$, имеют α -спираль протяженностью около двух витков. По обе стороны спирали основные цепи дипептидов $\text{Met}^5 - \text{Thr}^6$ и $\text{Thr}^{12} - \text{Pro}^{13}$ приобретают развернутые формы. Конформации А отличаются друг от друга ориентациями N-концевого участка $\text{Tyr}^1 - \text{Met}^5$, для которого выгодными оказываются почти все предпочтительные конформации молекулы Мет-энкефалина (сравните табл. III.22 и III.21), и положениями C-концевого участка. Таким образом, характерной особенностью структурных вариантов группы А является наличие жесткой нуклеации в центральной части молекулы при сравнительно лабильных N- и C-концевых фрагментах. В глобальной структуре α -эндорфина (A_1) энкефалиновый участок последовательности, сохраняя все свои выгодные внутренние контакты, эффективно взаимодействует с остальной частью молекулы (–18,0 ккал/моль). То же относится и к фрагменту $\text{Leu}^{14} - \text{Val}^{15} - \text{Thr}^{16}$, энергия взаимодействия которого с $\text{Tyr}^1 - \text{Pro}^{13}$ составляет около –8,0 ккал/моль. Существенную роль в стабилизации пространственной структуры α -эндорфина играют боковые цепи остатков Glu^8 и Lys^9 , находящиеся в середине последовательности и взаимодействующие одновременно с удаленными остатками на обоих концах цепи. Гидрофобная часть боковой цепи Glu^8 эффективно взаимодействует как с предшествующими остатками Tyr^1 (–3,0 ккал/моль), Phe^4 (–1,5), Met^5 (–3,0), так и с последующими Gln^{11} (–4,5), Thr^{12} (–1,6), Val^{15} (–3,3). Сближенной с обоими концами последовательности оказывается также боковая цепь Lys^9 , вызывая при этом, как и Glu^8 , незначительную дестабилизацию за счет взаимодействия с одноименно заряженным остатком Tyr^1 . Большая протяженность, высокая лабильность и наличие противоположных зарядов у боковых цепей позволяет остаткам Glu^8 и Lys^9 приблизительно с равным успехом играть цементирующую роль при

различных конформационных состояниях N- и C-концевых участков. Наилучшие условия для реализации остатками Glu⁸ и Lys⁹ дальних стабилизирующих взаимодействий предоставляет шейп пептидного скелета *effffffe* в центральной части последовательности.

Конформации группы В существенно отличаются от конформаций группы А, несмотря на, казалось бы, незначительные изменения шейпа одного дипептидного участка (Met⁵ – Thr⁶). Низкоэнергетические структуры в этом случае возможны только при одном, полностью свернутом (*fffff*) конформационном состоянии энкефалиновой последовательности. Конформации группы В характеризуются непрерывной спиральной формой основной цепи у додекапептидного фрагмента Tyr¹ – Thr¹², которая на участке Glu³ и Thr¹² представляет собой α -спираль; N-концевая часть последовательности в конформациях В удалена от остатков Glu⁸ и Lys⁹. Доминирующее значение в стабилизации структур имеют здесь средние взаимодействия, особенно между остатками в положениях 1–4–5. Относительная энергия лучшей конформации этой группы (В₁) выше глобальной (А₁) на 3,0 ккал/моль.

Группа С представлена всего двумя структурными вариантами с величинами $U_{\text{общ}} = 4,3$ и $7,2$ ккал/моль. Их особенность состоит в наибольшей сближенности и вследствие этого наличии эффективных электростатических и дисперсионных взаимодействий остатков на противоположных концах последовательности. Боковая цепь Lys⁹, однако, не образует здесь многочисленных контактов, как в конформациях А, а ориентирована преимущественно в среду.

В табл. III.22 приведены также энергетические вклады от ван-дер-ваальсовых (включающих водородные связи), электростатических и торсионных взаимодействий в низкоэнергетических конформациях α -эндорфина. Из сопоставления этих данных следует, что решающее значение в стабилизации пространственной структуры имеют невалентные, главным образом дисперсионные взаимодействия, или, иными словами, плотность упаковки гетерогенной аминокислотной последовательности. Между величинами $U_{\text{общ}}$ и $U_{\text{вдв}}$ нет четкой корреляции, хотя тенденции в их изменении аналогичны. Конформации А в среднем компактнее В и тем более С; в таком же порядке возрастает относительная энергия.

Какое-либо полезное сопоставление полученных данных о пространственной организации α -эндорфина с экспериментом сделать трудно. В работе Деслортерса и соавт. [171] исследованы спектры ЯМР и предположено существование в растворе ряда взаимопревращающихся конформеров α -эндорфина, что согласуется с рассмотренными результатами теоретического анализа.

γ - и δ -Эндорфины. Из общих соображений можно полагать, что увеличение длины пептидной цепи α -эндорфина всего лишь на один остаток Leu¹⁷, т.е. переход к γ -эндорфину, вряд ли приведет к существенным изменениям конформационных свойств молекулы. Тем не менее получить количественные характеристики пространственной организации γ -эндорфина представлялось целесообразным, тем более что конечной целью исследования является β -эндорфин. Во-первых, биологические испытания последовательности Tyr¹ – Thr¹⁶ и Tyr¹ – Leu¹⁷ проводятся параллельно, и

Шейпы пептидного скелета низкоэнергетических оптимальных конформаций γ -эндорфина

Группы конформаций	Шейп			$U_{\text{общ}}$ ккал/моль
	1-5-	-6-13-	-14-17	
A ₁			fefe	0
A ₂	eff	A effffffe	feff	9,5
A ₃			fefe	1,0
A ₄	eeef		efff	5,3
A ₅	efff		fffe	7,8
A ₆			feff	10,0
A ₇	ffff		fefe	3,1
A ₈			efff	6,5
A ₉	effe		fefe	4,5
A ₁₀			ffef	9,3
A ₁₁	fffe		fefe	5,2
B ₁		B ffffffe	fefe	3,0
B ₂	ffff		efff	7,0
B ₃			feee	8,6
C ₁	eeee	C eeeffffe	efef	5,2
C ₂	fffe		efff	5,2

может возникнуть необходимость в строгом соотношении функциональных спектров двух гормонов с полным набором их низкоэнергетических конформаций. Во-вторых, обнаруженные теоретически небольшие различия в пространственном строении α - и γ -эндорфинов могут быть использованы для экспериментальной проверки результатов расчета. В анализе γ -эндорфина учитывались все конформации α -эндорфина с относительной энергией до 20,0 ккал/моль и Leu¹⁷ в структурах фрагмента Pro¹³ – Leu¹⁷ с $U_{\text{общ}}$ до 5,0 ккал/моль. Предпочтительные оптимальные конформации гормона с энергией в интервале 0–10,0 ккал/моль представлены в обозначениях шейпов в табл. III.23. Действительно, радикальных изменений с появлением Leu¹⁷ не произошло. Как и у α -эндорфина, имеются три группы конформаций: А, В и С, энергетически и энтропийно неравноценных. По-прежнему шейп центрального фрагмента Met⁵ – Pro¹³ effffffe представляет наибольшую возможность для комплементарной упаковки большого числа низкоэнергетических конформационных состояний энкефалинового и С-концевого участков. Так же, как и ранее, большую роль в стабилизации структур этой группы играют остатки Glu⁸ и Lys⁹.

Для исследования пространственной структуры δ -эндорфина важно знать конформационные возможности свободного фрагмента Thr¹⁶ – Lys¹⁹. В анализе этого тетрапептида исходными приближениями служили наборы низкоэнергетических конформационных состояний соответствующих мети-

ламидов N-ацетил- α -аминокислот, проверенных расчетом перекрывающихся по двум остаткам трипептидов. В результате было составлено 115 структурных вариантов 12 различных форм, принадлежащих 8 шейпам пептидного скелета. Для расчета δ -эндорфина были оставлены 17 оптимальных конформаций фрагмента Thr¹⁶ – Lys¹⁹ пяти шейпов, попадающих в интервал 0–4,0 ккал/моль, и по одному лучшему представителю трех оставшихся шейпов большей энергии. В основу расчета δ -эндорфина (Tyr¹ – Lys¹⁹) легли 16 конформаций γ -эндорфина (см. табл. III.23) и отмеченные выше конформации C-концевого тетрапептида. Всего с учетом согласованности состояний двух общих у фрагментов Tyr¹ – Leu¹⁷ и Thr¹⁶ – Lys¹⁹ остатков было сформировано 130 структурных вариантов δ -эндорфина, принадлежащих 37 шейпам. После минимизации энергии и большой дополнительной работы по уточнению в интервал 0–10,0 ккал/моль попали 20 вариантов. Из них 14 составляют группу А со структурой центрального фрагмента Met⁵ – Pro¹³ *efffffe* и 6 – группу В (*fffffffe*). Все структурные варианты группы С у δ -эндорфина стерически несостоятельны из-за наталкиваний основных и боковых цепей C-концевых остатков на срединный участок последовательности. Попытки устранить наталкивания, не изменяя при этом структурный тип фрагмента Met⁵ – Pro¹³, т.е. не выходя за рамки данной группы, оказались тщетными.

При увеличении длины цепи от α - к γ - и далее к δ -эндорфину наблюдается определенная преемственность в пространственной организации гормонов. Во всех случаях, например, предпочтительными оказываются структуры группы А, а низкоэнергетические состояния N-концевых участков трех эндорфинов отвечают лучшим состояниям свободной молекулы Met-энкефалина. Между тем имеются и различия, которые, быть может, сказываются на функциональных свойствах гормонов. Уже отмечалось, что в глобальной конформации α -эндорфина энкефалиновый участок имеет структуру *efff*, а у γ -эндорфина – *eeef*. В лучшей структуре δ -эндорфина (A₁) этот участок опять приобретает структуру *efff*. Относительная энергия самой низкоэнергетической конформации молекулы с *eeef* структурой фрагмента Tyr¹ – Met⁵ составляет 6,9 ккал/моль. Иными словами, в ряду конформаций А, расположенных в порядке увеличения значений $U_{\text{общ}}$, переход от α - к γ - и δ -эндорфину сопровождается перераспределением конформационных состояний энкефалиновых фрагментов:

α -эндорфин – *efff*, *eeef*, *fffe*, *ffff*, *effe*;

γ -эндорфин – *eeef*, *efff*, *ffff*, *effe*, *fffe*;

δ -эндорфин – *efff*, *ffff*, *effe*, *eeef*, *fffe*.

Одновременно происходит изменение конформационных состояний общего у трех гормонов участка, примыкающего к противоположному концу α -спирального центрального фрагмента Met⁵ – Pro¹³. Так, глобальные конформации α - и δ -эндорфинов практически совпадают на участке Tyr¹ – Thr¹², но существенно отличаются на участке Pro¹³ – Thr¹⁶; у первого пептида он имеет форму RBRR (*fef*), а у второго – BRRR (*eff*). Относительная энергия структуры δ -эндорфина с идентичной глобальной

конформации α -эндорфина геометрией гексадекапептидного участка составляет ~5 ккал/моль, а энергия конформации α -эндорфина со структурой С-концевого тетрапептида типа *eff* – 9,2 ккал/моль. Таким образом, удлинение цепи, во всяком случае до размера δ -эндорфина, ведет к конформационной перестройке N- и С-концевых фрагментов.

Сказанное, но только в отношении С-концевых частей молекул, относится и к конформациям группы В. Лучшая среди них структура В₁, близкая у δ -эндорфина по энергии глобальной А₁, имеет состояния фрагментов Pro¹³ – Thr¹⁶ и Pro¹³ – Leu¹⁷ *eff* и *effff*, которые соответственно у α - и γ -эндорфинов приводят к структурам с $U_{\text{общ}} = 9,7$ (В₅) (см. табл. III.22) и 7,0 ккал/моль (В₂) (см. табл. III.23). В то же время относительная энергия конформаций В₄ и В₅ с состояниями этих фрагментов, такими же, как в самых предпочтительных структурах группы В у α - и γ -гормонов, равна 8,5 и 10,0 ккал/моль. Набор оптимальных конформаций δ -эндорфина с относительной энергией 0–10,0 ккал/моль использован в расчете конформационных возможностей β -эндорфина, аминокислотная последовательность которого состоит из 31 остатка.

β -Эндорфин. Заключительная часть конформационного анализа β -эндорфина также включала много промежуточных стадий (см. рис. III.23). После получения структурных данных, касающихся δ -эндорфина, были изучены конформационные возможности ункозапептидного фрагмента Thr¹ – Ala²¹. Расчет последнего предпринят на основе результатов анализа δ -эндорфина и гексапептидного участка Thr¹⁶ – Ala²¹, перекрывающихся по четырем аминокислотным остаткам. Исходные структурные варианты формировались из 20 конформационных состояний δ -эндорфина с $U_{\text{общ}} \leq 10,0$ ккал/моль и низкоэнергетических состояний 14 шейпов пептидного скелета Thr¹⁶ – Ala²¹ с $U_{\text{общ}} \leq 5,0$ ккал/моль. Всего было составлено 72 начальных приближения. После минимизации энергии в энергетический интервал 0–5,0 ккал/моль попали шесть конформаций, из которых четыре ($U_{\text{общ}} = 0; 2,6; 3,6; 3,7$ ккал/моль), имеющие на участке Met⁵ – Pro¹³ жесткую нуклеацию типа *effffffe*, составляют группу А, а две ($U_{\text{общ}} = 2,9; 4,0$ ккал/моль) с нуклеацией на том же участке типа *fffffffe* – группу В. В интервале 0–10,0 ккал/моль находятся соответственно 20 конформаций первой группы и 8 второй. Все они включены в конформационный анализ фрагмента Thr¹ – Asn²⁵.

Исследование пространственного строения пентакозапептидного участка β -эндорфина потребовало предварительного анализа конформационных возможностей более коротких фрагментов (Lys¹⁹ – Ile²³, Ile²² – Asn²⁵, Lys¹⁹ – Asn²⁵). Рассмотрение пентапептида (19–23) и тетрапептида (22–25) показало, что оба фрагмента в изолированном состоянии обладают значительной конформационной свободой. Набор исходных приближений пентапептида Lys¹⁹ – Asn²⁵ составил 311 структурных вариантов 43 шейпов пептидного скелета. Хотя последующая минимизация и не выявила существенной дифференциации структур по энергии, тем не менее полученные результаты сделали реальным конформационный анализ более сложного фрагмента. В интервал 0–6,0 ккал/моль попало около 100 конформационных состояний 17 шейпов гептапептида Lys¹⁹ – Asn²⁵. Все они

были включены вместе с 28 оптимальными конформациями фрагмента $\text{Tyr}^1 - \text{Ala}^{21}$ в исследование структуры пентакозапептида.

С учетом комплементарности состояний трех перекрывающихся остатков было составлено 114 структурных варианта участка $\text{Tyr}^1 - \text{Asn}^{25}$. Минимизация привела к результатам, которые свидетельствуют о дальнейшей энергетической дифференциации структур с увеличением длины цепи. Так, по мере приближения рассматриваемой последовательности к β -эндорфину все больше теряет конформационную подвижность N-концевой пентапептидный фрагмент $\text{Tyr}^1 - \text{Met}^5$. В наиболее низкоэнергетических конформациях пентакозапептида $\text{Tyr}^1 - \text{Asn}^{25}$ группы А энкефалиновый участок представлен уже единственной структурой типа *efff*, глобальной для свободной молекулы Met-энкефалина. Лучшая структура участка $\text{Tyr}^1 - \text{Asn}^{25}$ (A_1 , $U_{\text{общ}} = 0$ ккал/моль) включает конформационное состояние A_4 ($U_{\text{общ}} = 5,3$) γ -эндорфина и самое низкоэнергетическое состояние A_1 ($U_{\text{общ}} = 0$) δ -эндорфина. Для дальнейшего расчета были оставлены 44 оптимальных конформации фрагмента $\text{Tyr}^1 - \text{Asn}^{25}$, относительная энергия которых не превышала 10,0 ккал/моль.

Следующим крупным объектом на пути к конформационному анализу β -эндорфина явился фрагмент $\text{Tyr}^1 - \text{His}^{27}$, проявляющий физиологическую активность и известный в литературе как C'-фрагмент β -эндорфина. Его расчет был проведен путем состыковки перекрывающихся по двум остаткам участков $\text{Tyr}^1 - \text{Asn}^{25}$ и $\text{Lys}^{24} - \text{His}^{27}$. Минимизация 156 исходных вариантов C'-фрагмента привела к небольшому набору реальных конформаций. В интервал 0–5,0 ккал/моль попали 7 структур, а в интервал 0–10,0 ккал/моль – 16. Полученные результаты и в этом случае, как и в предшествующих, указывают на преемственность в структурной организации. С удлинением последовательности от α - к γ - и δ -эндорфинам и далее к C'-фрагменту β -эндорфина наблюдается сокращение низкоэнергетических конформационных состояний в группах С и В. Более предпочтительное положение как в численном (энтропийном), так и в энергетическом отношении занимают структуры типа А. У C'-фрагмента низкоэнергетическими вариантами группы В являются структуры, обладающие наибольшим сходством с соответствующими структурами группы А. Например, глобальные конформации обоих типов (A_1 и B_1) имеют одинаковый ход пептидной цепи на участке $\text{Ser}^7 - \text{Asn}^{25}$; они отличаются между собой только состоянием N-концевого гексапептидного фрагмента, т.е., по существу, структурой Met-энкефалинового участка и его ориентацией относительно остальной части последовательности.

Последним значительным этапом исследования пространственного строения β -эндорфина, непосредственно предшествующим анализу структуры всей молекулы нейропептида, был расчет конформационных возможностей тридекапептидного участка $\text{Lys}^{19} - \text{Gln}^{31}$. Его исходные структурные варианты были составлены на основе конформационных состояний $\text{Lys}^{19} - \text{His}^{27}$, входящих в предпочтительные структуры C'-фрагмента β -эндорфина, и низкоэнергетических конформаций пентапептидного фрагмента $\text{His}^{27} - \text{Gln}^{31}$ (см. рис. III.23). Формирование исходных приближений тридекапептида $\text{Lys}^{19} - \text{Gln}^{31}$ осуществлено с помощью семейства конформационных карт $\psi_{27} - \phi_{28}$, построенных при всех сочетаниях отмеченных

Шейпы пептидного скелета низкоэнергетических оптимальных конформаций β -эндорфина

Конформация группы A	Шейп	$U_{\text{общ}}$, ккал/моль
A ₁	eeefee	0
A ₂	ffeeff	0,7
A ₃	seffef	5,1
A ₄	efffefffffefff — { feeffee — { eeefef sefef efeeef	5,6
A ₅		6,9
A ₆		8,2
A ₇		
A ₈	feffeefe — { ffefef effeee	5,1
		6,2
A ₉	eefffee — ffefef	1,9

состояний фрагментов Lys¹⁹ – His²⁷ и Lys²⁸ – Gln³¹. В результате для сегмента пептидной цепи β -эндорфина Lys¹⁹ – Gln³¹ был получен набор из 340 вероятных конформаций; отвечающих (главным образом благодаря подвижности участка His²⁷ – Gln³¹) 170 различным шейпам пептидного скелета. После минимизации энергии в интервал 0–10,0 ккал/моль попали оптимальные конформации фрагмента Lys¹⁹ – Gln³¹ – всего 16 шейпов. Все они вошли в конформационный анализ β -эндорфина.

Значительная протяженность области перекрывания (нонапептидный участок) последовательностей Tyr¹ – His²⁷ и Lys¹⁹ – Gln³¹ позволила существенно сократить количество исходных для минимизации приближений β -эндорфина и свести конформационный анализ молекулы к расчету 48 структурных вариантов. После частичной и полной минимизации, а также снятия, где это было возможным, наталкиваний оказалось, что из всего набора лишь девять конформаций β -эндорфина обладают энергией $U_{\text{общ}}$, не превышающей 10,0 ккал/моль (табл. III.24). Все выгодные пространственные структуры гормона на участке Tyr¹ – Phe¹⁷ имеют одинаковое конформационное состояние, отвечающее одной из наиболее предпочтительных оптимальных конформаций свободной молекулы γ -эндорфина ($U_{\text{общ}} = 5,3$ ккал/моль) (см. табл. III.23). На участке Tyr¹ – Lys¹⁹ у β -эндорфина возможны два состояния, представляющие собой лучшие структуры δ -эндорфина ($U_{\text{общ}} = 0$ и 5,5 ккал/моль), на участке Tyr¹ – Asp²⁵ – три, а на участке Tyr¹ – His²⁷ – семь состояний, также относящихся к самым низкоэнергетическим конформациям соответствующих свободных фрагментов. Глобальная и следующая за ней конформации β -эндорфина (A₁ и A₂) (см. табл. III.24) имеют максимальную энергию стабилизирующих дисперсионных взаимодействий и, следовательно, отно-

сятся к наиболее компактным структурам. Энергия средних межста- точных взаимодействий у A_1 составляет 154,9 а у A_2 – 153,5 ккал/моль. Стабилизирующий эффект дальних взаимодействий у последовательности из 31 аминокислотного остатка заметно уступает силе средних взаимодей- ствий. У конформаций A_1 и A_2 их энергия составляет соответственно –20,7 и –24,0 ккал/моль. На некоторых участках пептидной цепи β -эн- дорфина выбор конформационного состояния за счет средних взаимо- действий оказывается практически однозначным. К таким конформа- ционно жестким нуклеациям относятся гексапептидный фрагмент $\text{Glu}^8 - \text{Pro}^{13}$, а также два пентапептидных фрагмента $\text{Val}^{15} - \text{Lys}^{19}$ и $\text{Ala}^{21} - \text{Asn}^{25}$. Промежуточные отрезки цепи, N-концевой и особенно C-концевой участки β -эндорфина следует считать конформационно лабильными. В отношении этих фрагментов средние взаимодействия сокращают у них число возможных конформационных состояний, т.е. определяют наборы приблизительно равновероятных структур. Детерминация лабильных по средним взаимодействиям участков осуществляется при сборке цепи за счет дальних взаимодействий, обеспечивающих образование наиболее эффективных контактов между нуклеациями. Расчет, однако, показал, что длина пептидной цепи β -эндорфина еще не достаточна для реализации, подобно белкам, одной трехмерной структуры. Пространственное строе- ние гормона характеризуется немногочисленным рядом близких по энергии конформационных состояний.

Г л а в а 12

ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ МЕЛАНОТРОПИНОВ

Меланотропины, или меланоцитстимулирующие гормоны (МСГ), – олигопептиды, секретирующиеся клетками промежуточной доли гипофиза хладнокровных позвоночных, птиц и млекопитающих. В настоящее время известны α -, β -, γ - и δ -формы меланотропинов (МСГ) млекопитающих, которые входят в состав одного предшественника, так называемого пре- проопиомеланокортина. α -Меланотропин всех животных имеет одинако- вую последовательность из 13 аминокислот и представляет собой N-кон- цевую часть адренокортикотропного гормона (АКТГ). Последователь- ность β -меланотропина является частью β -липотропина и с N-конца при- мыкает к β -эндорфину. β -МСГ обнаруживает видовые отличия. У чело- века этот гормон состоит из 22 аминокислотных остатков; у других млекопитающих он, как правило, включает 18 остатков. Обе формы мел- анотропинов содержат одинаковый гептапептидный фрагмент $\text{Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly}$ (4–10 у α - и 7–13 у β -МСГ). Существование γ -меланотропина, гомологичного α - и β -меланотропинам, было предсказано С. Наканиши и соавт. [138] при изучении N-концевой области пре-

проопиомеланокортина. Вскоре γ -МСГ был выделен как составная часть 28- и 25-членных олигопептидов, названных δ -МСГ, из гипофиза быка и промежуточной доли гипофиза крысы соответственно. Биологические свойства подробно изучены у β -меланотропина. Гормон этой формы стимулирует физиологические и морфологические изменения окраски кожи и волос. В первом случае в ответ на физиологические и фармакологические стимулы он вызывает быструю миграцию пигмента из центра клетки на периферию (дисперсию пигмента). Во втором случае при медленной адаптации к среде β -МСГ участвует в синтезе пигментов в меланоцитах.

Биологическое действие β -МСГ, как и других форм, не ограничивается меланотропной активностью, на которую прежде всего было обращено внимание, что и нашло отражение в названии семейства этих гормонов. Помимо влияния на пигментацию кожи и волос они обнаруживают ряд других активностей. Так, β -МСГ является сильнодействующим натрий- и калий-уретическим фактором, влияет на выделение гормона роста, проявляет стероидогенную, липолитическую активность, оказывает положительное влияние на нервную и мышечную системы. Инъекция β -МСГ млекопитающим и человеку вызывает увеличение частоты сердечных сокращений, гиперчувствительность и ряд поведенческих актов. Клинические данные показывают, что гормон повышает чувствительность сетчатки и улучшает адаптацию глаза к темноте. Имеются сведения, которые указывают на роль меланотропинов в качестве нейротрансмиттеров и нейромодуляторов центральной нервной системы. Отмечаются положительные эффекты МСГ на внимательность и память [198–206].

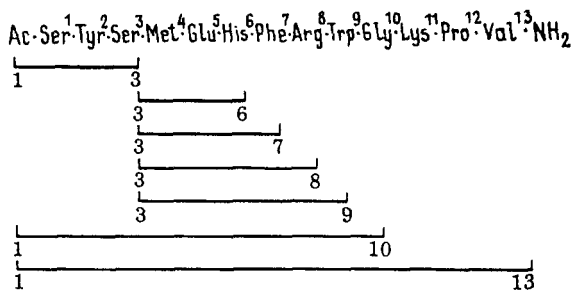
α -Меланотропин. Теоретический конформационный анализ молекулы α -МСГ выполнен Н.А. Ахмедовым и Е.М. Поповым в [163] по схеме, представленной на рис. III.27. Главное внимание было уделено расчету конформационных возможностей центрального участка гормона, который, как отмечалось, встречается также в последовательности β -меланотропина, рассматриваемого ниже. Энергетические характеристики оптимальных конформаций молекулы приведены в табл. III.25. Расчет выполнен при экранированных N- и C-концах последовательности и незаряженной боковой цепи His⁶.

Детальный конформационный анализ α -МСГ привел, по существу, к единственной трехмерной структуре тридекапептида. Как видно из табл. III.25, изменение шейпа пептидного скелета, а в пределах одного шейпа – изменение формы основной цепи приводят к резкому увеличению энергии. Разрыв в энергии между двумя самыми предпочтительными структурами с величинами $U_{\text{общ}} = 0$ и 1,1 ккал/моль и следующими за ними конформациями составляет около 8–9 ккал/моль. Повышение энергии при переходе от структур 1 и 3 к структурам 2 и 4–10 связано главным образом с потерей стабилизирующих контактов между N- и C-концевым остатками, т.е. с ослаблением дальних взаимодействий. В глобальной конформации энергия взаимодействия удаленных по цепи фрагментов $\text{Tyr}^2\text{--Met}^4$ с $\text{Pro}^{12}\text{--Val}^{13}$ составляет около –8,5 ккал/моль. В конформациях 2 и 4–10 N- и C-концы удалены друг от друга и стабилизирующих контактов между собой не образуют. В отношении средних взаимодействий все приведенные в табл. III.25 оптимальные конформации приблизительно экви-

Таблица III.25

Низкоэнергетические оптимальные конформации молекулы α -меланотропина

№ п/п	Шейп	Конформация	Конформационная энергия, ккал/моль			
			$U_{\text{общ}}$	$U_{\text{ядв}}$	$U_{\text{эл}}$	$U_{\text{торс}}$
1	$\begin{array}{c} \text{eff} \\ \text{eff} \\ \text{fff} \\ \text{eff} \end{array} \left\{ \begin{array}{c} \text{fee} \\ \text{fee} \\ \text{fee} \\ \text{fef} \end{array} \right.$	$B_{22}R_1R_{12}R_{222}R_{31}R_{23}B_3B_{3322}B_{31}RB_{2122}BB_3$	0	-81,1	5,4	10,4
2		$B_{22}R_1R_{12}R_{222}R_{31}R_{23}B_3B_{3322}R_{31}HB_{2322}BB_1$	9,3	-72,0	5,5	10,4
3		$R_{22}R_1R_{12}R_{222}R_{31}R_{23}B_3B_{3322}B_{31}RB_{2122}BB_3$	1,1	-80,5	5,2	11,0
4		$B_{22}R_1R_{12}R_{222}R_{31}R_{23}B_3B_{3322}R_{31}LB_{1222}RB_3$	8,9	-71,6	7,3	7,8
5	$\begin{array}{c} \text{eff} \\ \text{eff} \end{array} \left\{ \begin{array}{c} \text{fef} \\ \text{fef} \end{array} \right.$	$B_{22}R_1R_{12}R_{222}R_{31}R_{23}B_3B_{3322}B_{31}LB_{1222}RB_3$	8,1	-73,1	6,9	9,2
6		$B_{22}R_1R_{12}R_{222}R_{31}R_{23}B_3B_{3322}B_{31}HB_{1222}RB_3$	8,9	-71,2	7,4	7,3
7	$\begin{array}{c} \text{eff} \\ \text{eff} \end{array} \left\{ \begin{array}{c} \text{eff} \\ \text{fef} \end{array} \right.$	$B_{22}R_1R_{12}R_{222}R_{31}R_{23}B_3R_{3322}R_{33}BB_{1222}RB_3$	8,6	-71,3	6,7	7,7
8		$B_{22}R_1R_{12}R_{222}R_{31}R_{23}B_3R_{3322}R_{33}RB_{1222}BR_3$	9,9	-70,4	7,6	7,3
9	$\text{fff} \text{---} \text{fffe} \text{---} \text{fef}$	$R_{33}R_1R_{12}R_{222}R_{31}R_{23}B_3R_{3322}R_{33}LB_{1222}RB_3$	9,0	-71,7	6,3	9,1
10	$\text{fee} \text{---} \text{ffff} \text{---} \text{fef}$	$R_{12}B_1B_{32}R_{222}R_{31}R_{33}R_{21}R_{1222}R_{21}RB_{1222}RB_3$	9,8	-72,4	5,2	11,7

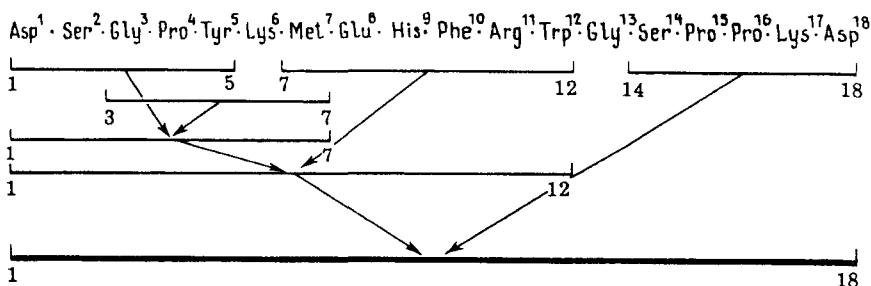


Р и с. III.27. Схема конформационного анализа молекулы α -меланотропина быка

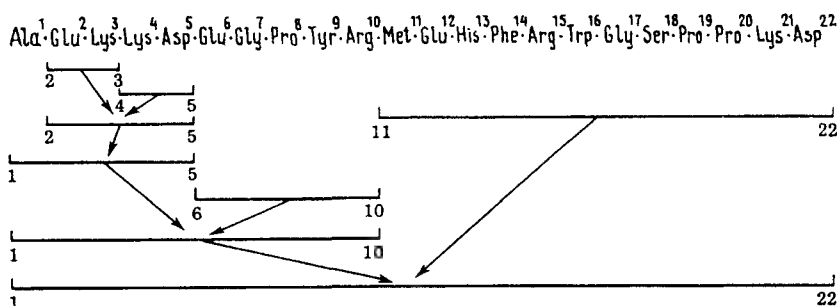
валентны. Поэтому можно ожидать увеличения конформационных возможностей молекулы α -МСГ при взаимодействии с различными рецепторами и проявления стереоспецифичности. В той же мере конформации 2 и 4–10 могут оказаться актуальными при встройке последовательности α -меланотропина в полипептидную цепь или при изменении природы ближайших остатков по обе стороны фрагмента Met⁴–Gly¹⁰. В самых низкоэнергетических структурах α -МСГ (1 и 3) боковые цепи Glu⁵, Arg⁸ и Lys¹¹ ориентированы от молекулы в среду. Такая направленность ионогенных групп, найденная с помощью построения соответствующих сечений потенциальной поверхности и минимизации, получилась автоматически в наиболее низкоэнергетических и компактных структурах молекулы α -МСГ. Боковая цепь Glu⁵ близко подходит к боковой цепи Arg⁸ и удалена от Lys¹¹.

Имеющиеся экспериментальные исследования пространственного строения адренокортикотропина и α -меланотропина касаются работ по КД и ЯМР-спектроскопии и флуоресцентному анализу. Ни один из этих методов не привел к ясному, обоснованному количественному представлению о структуре молекулы α -МСГ, а лишь позволил авторам высказать ряд соображений о некоторых ее вероятных особенностях. С. Ферманджан и другие авторы [207–210] предполагают, что N-концевой фрагмент Ser³–Trp⁹ АКГГ имеет α -спиральную структуру. В. Храбли и соавт. [211] высказали мысль, что основная цепь на участке Glu⁵–Gly¹⁰ характеризуется петлеобразным изгибом. В работе Г.И. Чипенса и соавт. [212] сделано заключение о значительной конформационной жесткости фрагмента Glu⁵–Gly¹⁰, что и определяет меланоцитстимулирующую активность гормона. Н.А. Юдаев и З.Ф. Утетева оценили по спектрам флуоресценции среднее расстояние между ароматическими кольцами остатков Tyr² и Trp⁹ в 9,0 Å [213]. Отмеченные предположения хорошо соответствуют изложенным результатам теоретического конформационного анализа, но противоречат результатам расчета α -меланотропина, выполненного Г.И. Чипенсом и соавт. [214]. В найденный ими набор низкоэнергетических конформаций не вошла ни одна структура гормона, представленная в табл. III.25. Причина столь резкого различия результатов расчетов [163, 214] обсуждается в гл. 14.

β -Меланотропины. В этом разделе рассмотрены конформационные воз-



Р и с. III.28. Схема конформационного анализа молекулы β-меланотропина быка



Р и с. III.29. Схема конформационного анализа молекулы β-меланотропина человека

возможности β-меланотропинов быка и человека, последовательности которых содержат соответственно 18 и 22 аминокислотных остатка. Основные этапы фрагментарного анализа пространственного строения β-меланотропина быка [31] показаны на рис. III.28. Расчет конформационных возможностей каждого из выделенных в схеме фрагментов, в свою очередь, включал несколько стадий. Минувя многие детали, начнем рассмотрение сразу с результатов анализа всей молекулы. В табл. III.26 приведены шейпы пептидного скелета вероятных структур гормона, относительная энергия которых попадает в интервал – 0–12,0 ккал/моль; их всего 12. Столь резкая дифференциация конформаций Asp¹–Asp¹⁸ по энергии, которая произошла при объединении низкоэнергетических состояний свободных фрагментов в единую цепь, свидетельствует об уникальности условий реализации значительных стабилизирующих взаимодействий между удаленными остатками при максимально плотной упаковке и согласованности взаимодействий на всех участках последовательности природного октадекапептида. Не случайно, что эти условия, т.е. наличие стерической комплементарности всех участков молекулы, удовлетворяются только при комбинациях единичных, самых выгодных конформационных состояний фрагментов. Именно данное обстоятельство обуславливает, во-первых, детерминированный, а не статистический механизм спонтанной и безошибочной сборки аминокислотной последовательности в нативных условиях и, во-вторых, быстрое смещение конформационного равновесия в

Шейпы пептидного скелета низкоэнергетических конформаций молекулы β -меланотропина быка

№ п/п	Шейп 1-7-13-18	Конформационная энергия, ккал/моль			
		$U_{\text{общ}}$	$U_{\text{вдв}}$	$U_{\text{эл}}$	$U_{\text{торс}}$
1	feffee	0	-94,9	-4,4	17,7
2					
3		7,6	-83,3	-3,0	12,3
4					
5	efffee	0,5	-88,8	-3,6	11,4
6					
7		1,9	-89,9	-3,9	14,1
8					
9		3,0	-89,7	1,1	10,1
10					
11		6,6	-83,1	-4,0	12,1
12					

сторону актуальной структуры гормона под действием специфического рецептора или иных межмолекулярных сил. Из табл. III.26 видно, что все предпочтительные структуры молекулы β -МСГ представляют собой комбинации трех конформаций участка Asp¹-Met⁷, восьми – Met⁷-Gly¹³ и двух конформаций участка Gly¹⁴-Asp¹⁸, имеющих, как показал расчет, минимальные значения энергии для указанных фрагментов в свободном состоянии. Нельзя не обратить внимание на следующий интересный момент, наглядно демонстрирующий роль межостаточных взаимодействий в структурной организации пептидов. Расчет α -меланотропина, как отмечалось выше, привел к заключению о значительной конформационной жесткости гентапептидного фрагмента Met⁴-Gly¹⁰. Расчет же β -меланотропина, содержащего точно такой же участок в положении 7-13, показал, что при ином окружении он относится к наиболее лабильным фрагментам молекулы. В правой части табл. III.26 приведены энергетические вклады внутри- и межостаточных дисперсионных, электростатических и торсионных взаимодействий. Они свидетельствуют об альтернативном характере стабилизации различных низкоэнергетических конформаций молекулы гормона. Например, в глобальной конформации энергия дисперсионных меж-

остаточных взаимодействий на 5,0 ккал/моль ниже соответствующей энергии у непосредственно следующей за ней конформации с $U_{\text{общ}} = 0,5$ ккал/моль. Благодаря этому положение равновесия становится чувствительным к внешним условиям и будет смещаться в сторону второй структуры при переходе от полярной среды к гидрофобной. Конформация, уступающая глобальной 8,7 ккал/моль, на первый взгляд малоперспективна. Высокая энергия этой конформации связана с небольшим вкладом в стабилизацию межостаточных электростатических взаимодействий. Однако она является самой стабильной по дисперсионным взаимодействиям. Поэтому можно ожидать, что в сильнополярных средах, где роль внутримолекулярных электростатических взаимодействий значительно снижается, конформация с $U_{\text{общ}} = 8,7$ ккал/моль окажется наиболее предпочтительной.

Обратимся теперь к β -меланотропину человека, аминокислотная последовательность которого представляет собой пептидную цепь рассмотренного нами β -меланотропина быка, продолженную на N-конце тетрапептидом $\text{Ala}^1\text{--Glu}^2\text{--Lys}^3\text{--Lys}^4$. Октадекапептидные участки гормонов (соответственно 1–18 и 5–22) отличаются лишь двумя остатками; вместо Ser^2 и Lys^6 у β -МСГ быка в последовательности β -МСГ человека находятся соответственно остатки Glu^6 и Arg^{10} (рис. III.29). Несмотря на близость химического строения двух родственных гормонов, конформационный анализ β -меланотропина человека выполнен в значительной мере независимо от результатов расчета гормона быка (сравните рис. III.28 и III.29). Из полученных ранее данных были использованы в качестве исходных структурных вариантов конформационные состояния додекапептидного фрагмента $\text{Met}^7\text{--Asp}^{18}$ β -МСГ быка. Расчет N-концевой половины $\text{Ala}^1\text{--Arg}^{10}$ гормона человека, существенно отличающейся от соответствующего участка гормона быка, выполнен по схеме, приведенной на рис. III.29. Пропустим все промежуточные стадии конформационного анализа β -МСГ $\text{Ala}^1\text{--Asp}^{22}$ и перейдем сразу к обсуждению результатов расчета завершающего этапа и сопоставлению их с данными анализа β -МСГ $\text{Asp}^1\text{--Asp}^{18}$. У молекулы β -меланотропина человека было проанализировано 220 начальных приближений, составленных из 20 оптимальных конформаций фрагмента $\text{Ala}^1\text{--Arg}^{10}$ и 11 оптимальных конформаций фрагмента $\text{Met}^{11}\text{--Asp}^{22}$, представляющих собой лучшие структурные варианты различных шейпов пептидного скелета. В результате полной и частичной минимизации энергии, построения конформационных карт и снятия наталкиваний оказалось, что только девять оптимальных конформаций обладают относительной энергией, не превышающей 10 ккал/моль (табл. III.27). Как и во всех других рассмотренных случаях, низкоэнергетические пространственные структуры молекулы являются комбинациями предпочтительных состояний фрагментов. Количество выгодных конформаций на ряде участков последовательности ограничено, а их сочетания обнаруживают чрезвычайную чувствительность к энергии межостаточных взаимодействий. Наиболее подвижной в структурах молекул β -МСГ человека и быка является последовательность $\text{Met}^{11}\text{--Gly}^{17}$ ($\text{Met}^7\text{--Gly}^{13}$). У октадекапептида конформационные возможности этого участка характеризуют восемь низкоэнергетических состояний (см. табл. III.26), а у докозапепти-

Шейпы пептидного скелета низкоэнергетических конформаций молекулы β -меланотропина человека

№ п/п	Шейп				Конформационная энергия, ккал/моль			
	1-5	6-11	12-17	18-22	$U_{\text{общ}}$	$U_{\text{вдв}}$	$U_{\text{эл}}$	$U_{\text{торс}}$
1			<i>efffef</i> — <i>eeefe</i>		0	-129,1	6,2	16,4
2				<i>feeff</i>	3,6	-121,1	-5,7	24,2
3		<i>fffff</i>	<i>fffeff</i>	<i>eeeff</i>	5,5	-115,1	-9,7	24,5
4			<i>feeffe</i> — <i>eeefe</i>		4,9	-119,1	-6,8	24,5
5	<i>efff</i>	<i>effffe</i>	<i>fffffe</i>	<i>eeefe</i>	8,0	-113,4	-3,3	18,3
6				<i>feeff</i>	8,1	-112,6	-2,3	16,6
7			<i>fffeff</i>	<i>eeeff</i>	8,8	-113,7	-0,6	19,6
8		<i>fffffe</i>	<i>efffff</i>	<i>eeefe</i>	9,1	-122,4	2,3	22,8
9		<i>eeefff</i>	<i>feefff</i>	<i>eeeff</i>	9,4	-114,1	4,4	13,2

да — пять состояний, входящих в состав отмеченных восьми (табл. III.27). Особенно близки у обоих гормонов конформационные возможности С-концевых гексапептидных участков Gly¹⁷–Asp²² (Gly¹³–Asp¹⁸), описываемые структурами шейпов *eeefe*, *feeff* и *eeeff*. Что касается пространственного строения гомологичных N-концевых фрагментов Asp⁵–Met¹¹ и Asp¹–Met⁷ молекул β -МСГ человека и быка, то оно существенно различно в обоих случаях. Это связано не столько с заменой Ser на Glu и тем более Lys на Arg, сколько с появлением у β -меланотропина человека тетрапептидного фрагмента Ala¹–Glu²–Lys³–Lys⁴, включающего четыре ионогенных остатка, три из которых имеют сложные боковые цепи.

Глобальные и некоторые другие низкоэнергетические конформации гормонов имеют одинаковые состояния фрагментов Met¹¹–Asp²² и Met⁷–Asp¹⁸ и отличаются состояниями фрагментов Asp⁵–Met¹¹ и Asp¹–Met⁷ (см. табл. III.26 и III.27). Следовательно, ответственными за одинаковые функции β -меланотропинов человека и быка являются близкие по своей структурной организации С-концевые додекапептидные участки гормонов. Молекулы β -меланотропинов человека и быка включают большое число ионогенных атомных групп (соответственно 13 и 9 с приблизительным равенством положительных и отрицательных целочисленных зарядов). Силы отталкивания и притяжения зарядов в лучших конформациях гормонов в значительной мере компенсируют друг друга; суммарная энергия электро-

статических взаимодействий составляет лишь несколько процентов от общей конформационной энергии. Однако это не значит, что электростатический вклад не существен в определении конформационного равновесия. Определяющую роль здесь играют внутренний компенсационный характер и альтернативность электростатических взаимодействий по отношению к дисперсионным взаимодействиям, а также то обстоятельство, что из всех видов взаимодействий валентно-несвязанных атомов электростатические силы относятся к самым дальним и чувствительным к окружению.

γ-Меланотропин. Молекула γ-меланотропина быка представляет собой пептидную цепь из 12 аминокислотных остатков: Tyr¹-Val²-Met³-Gly⁴-His⁵-Phe⁶-Arg⁷-Trp⁸-Asp⁹-Arg¹⁰-Phe¹¹-Gly¹². Типичный для α- и β-форм меланотропинов гептапептидный участок Met³-Glu⁴-His⁵-Phe⁶-Arg⁷-Trp⁸-Gly⁹ здесь модифицирован; остаток Glu⁴ заменен на Gly⁴, а Gly⁹ – на Asp⁹. Отрицательный заряд как бы передвинут с начала участка на конец. Среди рассмотренных меланотропинов γ-МСГ содержит наименьшее число остатков. Тем не менее расчет этого гормона оказалась наиболее многоступенчатым и трудоемким, что связано со слабой дифференциацией конформационных состояний по энергии и необходимостью анализа большого количества структурных вариантов. Потребовалось рассмотрение целого ряда ди-, три- и тетрапептидов, низкоэнергетические конформации которых послужили исходными в расчете фрагментов Tyr¹-Phe⁶, His⁵-Arg¹⁰ и His⁵-Gly¹². На завершающем этапе были использованы низкоэнергетические структуры гексапептида Tyr¹-Phe⁶ и октапептида His⁵-Gly¹², принадлежащих соответственно 21 и 27 шейпам пептидного скелета и имеющих энергию < 7,0–8,0 ккал/моль. Всего было проанализировано 228 конформаций γ-МСГ 216 форм основной цепи 168 шейпов. Минимизация энергии не выявила существенной детерминации оптимальных структур. В интервал 0–10,0 ккал/моль попало 78 конформаций 14 типов, которые приведены в табл. III.28. Полученные данные, таким образом, свидетельствуют об отсутствии в последовательности γ-МСГ в отличие от других меланотропинов четких нуклеационных участков, складывающихся в определенную структуру под воздействием средних взаимодействий.

Таблица III.28

Шейпы пептидного скелета оптимальных конформаций
молекулы γ-меланотропина

Шейп	$U_{\text{общ}}$ ккал/моль	* n	Шейп	$U_{\text{общ}}$ ккал/моль	* n
<i>efeeffffffe</i>	0	4	<i>efeeffefeee</i>	5,7	3
<i>ffffefeffef</i>	1,8	12	<i>efeeffeeef</i>	5,8	1
<i>eeeffeffef</i>	2,7	4	<i>ffffefeeef</i>	6,3	2
<i>ffffefffff</i>	3,6	15	<i>ffffeeefeee</i>	6,4	8
<i>ffffeeeffef</i>	3,7	17	<i>efeeffeffef</i>	6,6	4
<i>efeeffefeee</i>	4,5	2	<i>ffffeeefee</i>	7,4	3
<i>efeeffefeee</i>	5,1	2	<i>ffffeeefefe</i>	8,4	2

* n – число однотипных структур γ-меланотропина, отличающихся конформационными состояниями участка Tyr¹-Gly⁴.

ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ СЕКРЕТИНА

Низкомолекулярные пептиды, в частности пептидные гормоны, как правило, наделены несколькими функциями. В этом отношении они отличаются от белков, которые, за редким исключением, монофункциональны. Физиологическое действие отдельного природного пептида часто проявляется в совершенно различных системах организма и по своему характеру настолько разнообразно, что в такой сложной картине подчас трудно увидеть стимулирующее начало одного соединения и обнаружить между многими активностями пептида какую-либо связь. Несмотря на сложность функционального спектра, механизмы всех физиологических действий пептида совершенны по своей избирательности, чувствительности и эффективности. Поэтому при изучении конкретной функции возникает представление о молекулярной структуре пептида как о специально предрасположенной для выполнения только единичного рассматриваемого действия. Природным олигопептидам присуща согласованность двух на первый взгляд взаимоисключающих качеств – полифункциональности и строгой специфичности. Подход к установлению количественной зависимости между строением и биологической активностью олигопептидов, детально рассматриваемый в следующем томе монографии "Проблема белка", включает решение двух структурных задач, названных автором данной монографии [28] прямой и обратной. Прямая задача заключается в выявлении всех низкоэнергетических конформационных состояний природного олигопептида, которые потенциально, как будет показано, являются физиологически активными. Эта задача требует знания только аминокислотной последовательности молекулы и решается на основе теории и расчетного метода, использованных уже в анализе структурной организации многих олигопептидов. Обратная структурная задача по своей постановке противоположна первой. Ее назначение заключается в априорном предсказании химических модификаций природной последовательности, приводящих к таким искусственным аналогам, каждый из которых имеет пространственное строение, отвечающее конформации, актуальной лишь для одной функции исходного соединения. Конечная цель решения обратной задачи, таким образом, состоит в прогнозировании монофункциональных аналогов, которые бы только в своей совокупности воспроизводили полный набор низкоэнергетических конформаций природного пептида и весь спектр его биологического действия (подробно см. гл. 17).

Настоящая глава посвящена структурной организации пептидного гормона секретина, т.е. обсуждению результатов решения прямой структурной задачи, достаточно сложной для теоретического конформационного анализа молекулы [215]. В. Бейлисс и Э. Старлинг [216] в самом начале нашего века обнаружили в слизистой оболочке верхней части тонких кишок некий химический фактор, который, освобождаясь при контакте с соляной кислотой и всасываясь в кровь, стимулировал отделение панкреатического секрета гуморальным путем. Он был назван секретинном и отнесен к группе гормонов, название которой впервые и появилось в связи с

открытием этого стимулирующего фактора. Химическое строение секретина было установлено Дж. Джорпесом [217]. Оказалось, что он представляет собой олигопептид, состоящий из 27 аминокислотных остатков. Синтез всей последовательности секретина осуществлен М. Бодански и соавт. [218].

Секретин, как и глюкагон, вазоактивный интестинальный пептид, гастрин, гастроингибирующий пептид и ряд других, относится к гормонам желудочно-кишечного тракта. Считается, что основная роль секретина состоит в регуляции секреции сока поджелудочной железы [219], куда он попадает с током крови и где также оказывает стимулирующий эффект на секрецию инсулина [220, 221]. Позднее был выявлен ряд других функций секретина в пищеварительной системе. Оказалось, что он стимулирует выделение пепсина желудком и бикарбонатов и воды поджелудочной железой и печенью, влияет на сокращение пилорического канала, торможение моторики желудка, приводит к ослаблению электрической активности тонких кишок, усилению кровотока в поджелудочной железе, интенсификации липолиза и гликолиза в жировой ткани, торможению реабсорбции бикарбонатов в почках и т.д. [222].

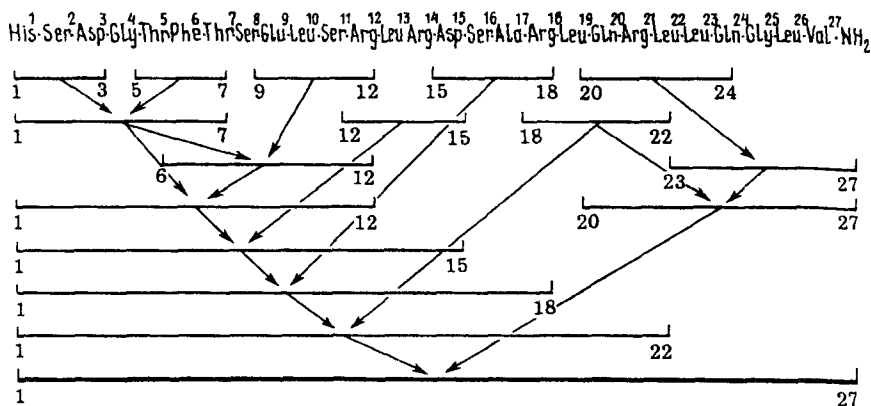
Секретин, как и другие пептиды кишечно-желудочного тракта, был найден также в центральной нервной системе, что указало на возможность его нейроэндокринной активности [223, 224]. Действительно, позднее обнаружилось влияние секретина на отделение нейрогомонов в передней доле гипофиза [225]. Выяснено, что он ускоряет круговорот и увеличивает содержание дофамина в медиальной эминенции, повышает обмен норадреналина в паравентрикулярных ядрах гипоталамуса и снижает секрецию пролактина [224]. Предполагается также участие секретина в функционировании симпатической нервной системы [225, 226]. В опытах с крысами при введении секретина наблюдалось, например, увеличение частоты и силы сердечных сокращений, причем эффект имел место как при спонтанных, так и при электростимулированных сердцебиениях; действие секретина при этом не подавлялось пропранололом [227, 228].

Таким образом, секретин в качестве гормона участвует в деятельности пищеварительной системы, центральной нервной системы и симпатической части вегетативной нервной системы, причем в каждой из них он выполняет ряд регуляторных, а возможно, и других функций. Иными словами, молекула секретина полифункциональна. Исследование разнообразных натуральных и синтетических фрагментов секретина показало, что всем спектром гормональной активности обладает целая интактная молекула [229, 230]. В структурных исследованиях обычно используют синтетический гормон [231–233]. Кривые КД и ДОВ синтетического секретина и его фрагмента (5–27) оказались сходными по основным характеристикам [233]; был сделан вывод, что в стабилизации конформации секретина в растворе вклад его N-концевого тетрапептидного участка невелик. Исследование методом кругового дихроизма последовательно наращиваемых синтетических фрагментов секретина показало, что пептидная цепь молекулы частично свернута в α -спиральную форму [232–234]; были выделены два потенциально возможных спиральных участка – один в N-концевой, другой

С-концевой частях пептида. Существенное значение в стабилизации конформации секретина, по мнению М. Бодански и соавт. [235], должны играть взаимодействия между отрицательно заряженными остатками Glu⁹ и Asp¹⁵ и положительно заряженными остатками четырех аргининов (Arg¹², Arg¹⁴, Arg¹⁸, Arg²¹) последовательности молекулы, поскольку замещения Glu⁹ и Asp¹⁵ соответственно на нейтральные остатки Gln⁹ и Asn¹⁵ приводило к заметному изменению спектров КД исходного соединения. Применение ЯМР-спектроскопии [236] привело к предположению о наличии структуры секретина, предпочтительной для кислой среды, стабилизированной взаимодействиями остатков на участках последовательности 1–14 и 15–27. В то же время результаты ряда других экспериментальных исследований дают основание полагать, что секретин довольно устойчив и не теряет биологических свойств как в чистой воде, так и в присутствии липидов [237–239].

По аналогии со структурами фрагмента 1–29 релизинг фактора гормона роста, его аналогов и глюкагона секретину, принадлежащему к одному с ними семейству, приписывается полностью α -спиральная конформация [240–243]. В работе [244] исследовано пространственное строение молекулы секретина в растворе диметилсульфоксида с помощью ¹H-ЯМР-димерной спектроскопии с привлечением эффекта Оверхаузера и эмпирических корреляций. Полученный набор из 98 значений двугранных углов ϕ и межатомных расстояний использован в качестве исходного экспериментального материала для расчета структуры секретина методом молекулярной динамики. Определение проводилось в два этапа. Сначала рассчитывалась серия конформаций, удовлетворяющих вводимым опытным значениям. Затем у них были отобраны десять наиболее близких структурных вариантов, на основе которых построена новая конформация молекулы, в наибольшей степени соответствующая, по мнению авторов, результатам экспериментальных измерений. После тщательной минимизации она была признана глобальной структурой гормона в растворе DMSO. Поскольку полностью пространственное строение секретина описывается более 130 независимыми конформационными параметрами, то расчет Т. Бланделла и С. Вуда [244], выполненный на основе 98 экспериментальных данных, не может считаться объективным, особенно если в растворе реализуется не одна конформация, а несколько.

Определение структурной организации секретина, проникновение в область его взаимоотношений с рецепторами, принадлежащими разным системам организма, выяснение кинетики и динамики механизмов этих отношений, понимание на атомно-молекулярном уровне назначения секретина в их реализации, умение целенаправленно влиять на его регуляторные и другие физиологические действия и, наконец, создание соответствующих фармацевтических препаратов – все это не может быть достигнуто традиционным путем, т.е. на чисто эмпирической основе и при использовании исключительно экспериментальных методов, как бы разнообразны и совершенны они не были. Даже первый шаг в сторону сознательного количественного изучения структурно-функциональной организации секретина, а именно исследование конформационных возможностей молекулы и определение набора ее низкоэнергетических пространствен-



Р и с. III.30. Схема конформационного анализа молекулы секретина

ных структур, нельзя сделать иначе как только на основе конформационной теории природных пептидов и соответствующего метода расчета.

Как и в рассмотренных выше случаях, здесь нельзя привести и обсудить все детали априорного расчета трехмерной структуры молекулы секретина. В этой главе представлены в сжатой и полук количественной форме данные о всех этапах конформационного анализа секретина и описаны особенности структурной организации гормона.

Конформационный анализ секретина выполнен по представленной на рис. III.30 схеме, в которой порядок расчета фрагментов указан стрелками. Напомним, что при наличии согласованности всех видов внутримолекулярных взаимодействий способ разбиения аминокислотной последовательности на отдельные фрагменты и порядок расчета не имеют принципиального значения и не влияют на конечный результат. Схема теоретического конформационного анализа диктуется техническими, иногда интуитивными соображениями, а чаще всего подсказывается самим ходом решения задачи. Поэтому лишь в конце расчета становится ясным окончательный вариант разбиения цепи на участки и последовательность их анализа. Исследование конформационных возможностей N-концевого гептапептидного фрагмента секретина His¹-Thr⁷ было начато с детального анализа пространственного строения его трипептидных участков His¹-Ser²-Asp³ и Thr⁵-Phe⁶-Thr⁷. Затем при всех возможных сочетаниях найденных низкоэнергетических состояний трипептидов рассчитывались потенциальные поверхности гептапептида путем построения семейства конформационных карт ϕ_4 - ψ_4 срединного остатка Gly⁴. Значения двугранных углов ϕ_4 , ψ_4 низкоэнергетических областей каждой конформационной карты и геометрия соответствующей комбинации предпочтительных конформаций свободных трипептидов служили исходными для минимизации структурных вариантов His¹-Thr⁷. Для первого трипептида было составлено 125 начальных приближений, а для второго – 82. Результаты минимизации структурных вариантов при изменении двугранных углов основной цепи (ϕ , ψ , ω) и боковых цепей (χ) свидетельствуют о слабой энергетической

дифференциации конформаций обоих трипептидов по шейпам; фактически равновероятными для них являются состояния всех возможных структурных типов (*ee*, *ef*, *fe* и *ff*). Более существенная дифференциация наблюдается по формам основной цепи в пределах одного шейпа. Во всех случаях предпочтительными оказываются конформации с R- и В-формами остатков. Для дальнейшего анализа оставлены наборы низкоэнергетических конформаций His¹-Asp³ и Thr⁵-Thr⁷ всех четырех типов. В их состав вошли все варианты с R- и В-формами остатков, а у шейпов *ee* и *fe*, кроме того, и с L-формой.

Около 300 конформационных карт ϕ_4 - ψ_4 , построенных при фиксированной в отобранных низкоэнергетических состояниях геометрии трипептидных участков, которые расположены по обеим сторонам Gly⁴, позволили обнаружить на потенциальной поверхности 262 области низкой энергии. Они отвечали 133 различным формам основной цепи фрагмента His¹-Thr⁷, принадлежащим 64 шейпам, т.е. максимально возможному для гептапептида количеству структурных типов. Все они были приняты в качестве исходных приближений для минимизации энергии при вариации углов ϕ , ψ , ω и χ . Результаты минимизации показали, что N-концевой гептапептидный участок секретина в своем свободном состоянии обладает большой конформационной свободой. В интервал относительной энергии 0–5,0 ккал/моль попадают 60 его оптимальных конформаций 22-х существенно различных шейпов пептидного скелета, а в интервал 0–10,0 ккал/моль – 202 конформации 57 шейпов. Самые выгодные по энергии и наиболее представительные по числу низкоэнергетических вариантов (следовательно, предпочтительные и по энтропии) конформации фрагмента His¹-Thr⁷ принадлежат шейпам *fffeff* (0; 4), *eefeef* (0,5; 6), *effeef* (0,6; 6), *fffeef* (1,0; 10), *eeffef* (1,9; 2), *fffeff* (2,1; 3), *effeef* (2,2; 4); в скобках первое число означает минимальную относительную энергию конформации, а второе – количество конформаций в интервале 0–5,0 ккал/моль. Наиболее низкоэнергетические структуры гептапептида во всех случаях представляют собой комбинации самых выгодных состояний трипептидов. При объединении последних в единый фрагмент возникают дополнительные стабилизирующие взаимодействия, которые, однако, не нарушают взаимодействий, сложившихся ранее на более коротких свободных участках последовательности. Для дальнейшего конформационного анализа были оставлены все конформации гептапептида His¹-Thr⁷ с энергией от 0 до 5,0 ккал/моль.

Совместное рассмотрение тетрапептидов Glu⁹-Arg¹², Arg¹²-Asp¹⁵ и Asp¹⁵-Arg¹⁸ вызвано наличием определенной аналогии в их химическом строении, проявляющейся в конформационных возможностях фрагментов. Все они имеют на обоих концах своих цепей остатки, боковые цепи которых несут целочисленные разноименные заряды. Следовательно, уже из общих соображений можно предположить, что наиболее предпочтительными будут у них конформации шейпов, обеспечивающих сближенность первого и четвертого остатков и тем самым образование между ними эффективных электростатических и дисперсионных взаимодействий. Такими шейпами для тетрапептидов являются *eef*, *eff*, *ffe* и *fff*. Далее можно полагать, что из них самым выгодным будет шейп *fff*, т.е. виток

α -спирали, стабилизация которого осуществляется не только благодаря сближенности боковых цепей первого и четвертого остатков, но также за счет водородных связей и эффективных взаимодействий в этом случае всех элементов пептидной цепи. У тетрапептида $\text{Arg}^{12}\text{-Leu}^{13}\text{-Arg}^{14}\text{-Asp}^{15}$ с конформациями типа *fff* могут конкурировать лишь конформации *eff*, аналогичные в отношении отмеченных стабилизирующих взаимодействий и, как и при шейпе *fff*, обеспечивающие удаленность положительных зарядов боковых цепей остатков Arg^{12} и Arg^{14} . Относительно высокой энергией у всех трех тетрапептидов должны обладать конформации шейпов *eee*, *eef*, *fee* и *fef*, у которых значительно менее эффективны взаимодействия между концевыми остатками, а у фрагмента $\text{Arg}^{12}\text{-Asp}^{15}$, кроме того, велики дестабилизирующие взаимодействия между сближенными при этих шейпах остатками Arg^{12} и Arg^{14} . Результаты расчета полностью подтвердили эти соображения.

Дальнейшее исследование пространственного строения секретина трудно было проводить путем прямого перехода от фрагментов $\text{His}^1\text{-Thr}^7$ и $\text{Glu}^9\text{-Arg}^{12}$ к участку $\text{His}^1\text{-Arg}^{12}$ из-за конформационной лабильности N-концевого гептапептида. Оказалось целесообразным предварительное рассмотрение конформационных возможностей фрагмента $\text{Phe}^6\text{-Arg}^{12}$. Его расчет базировался на результатах анализа тетрапептида $\text{Glu}^9\text{-Arg}^{12}$ и данных о низкоэнергетических состояниях свободных монопептидов Phe , Thr и Ser . Были учтены все конформации $\text{Glu}^9\text{-Arg}^{12}$ шейпов *efe*, *eff*, *ffe*, *fff* с энергией, меньшей 5,0 ккал/моль. Другой тетрапептидный участок $\text{Phe}^6\text{-Glu}^9$ представляли в расчете структурные варианты максимально возможных для него восьми типов. Всего было рассмотрено около 250 структур 32 шейпов гептапептидного скелета. Минимизация энергии по углам ϕ , ψ , ω и χ выявила резкую энергетическую дифференциацию конформаций $\text{Phe}^6\text{-Arg}^{12}$. В интервал 0–10,0 ккал/моль вошло только восемь структур фрагмента, причем все они имеют преимущественно свернутую форму основной цепи, а глобальной является полностью α -спиральная структура.

Исследование конформационных возможностей додекапептида $\text{His}^1\text{-Arg}^{12}$ проведено по данным анализа его гептапептидных фрагментов, перекрывающихся по двум остаткам. Минимизации энергии было подвергнуто ~ 150 вариантов. Все оптимальные пространственные структуры $\text{His}^1\text{-Arg}^{12}$ с относительной энергией в интервале 0–10,0 ккал/моль приведены в табл. III.29. Расчет позволяет сделать заключение, что N-концевой додекапептидный участок секретина по своим конформационным свойствам четко делится на две части: лабильную ($\text{His}^1\text{-Phe}^6$) и жесткую ($\text{Thr}^7\text{-Arg}^{12}$), причем энергия конформаций зависит прежде всего от структуры жесткого компонента. Самой выгодной для него является α -спираль ($U_{\text{общ}} = 0$ ккал/моль), а затем следуют свернутые структуры типа *eeffff* (6,3 ккал/моль), *fffffe* (6,4 ккал/моль) и *efffff* (8,6 ккал/моль). Спектр энергетического распределения конформаций додекапептида можно представить себе в виде небольшого количества основных уровней и более многочисленных подуровней. Основные уровни определяются конформационными состояниями фрагмента $\text{Thr}^7\text{-Arg}^{12}$. Около каждого из них со стороны более высоких значений энергии располагается семейство

Относительная энергия ($U_{\text{общ}}$) и энергетические вклады ван-дер-ваальсовых ($U_{\text{вдв}}$), электростатических ($U_{\text{эл}}$) и торсионных ($U_{\text{торс}}$) взаимодействий у оптимальных конформаций фрагмента His¹-Arg¹² секретины

Шейп		Конформация												Конформационная энергия, ккал/моль			
1-6	7-12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$U_{\text{общ}}$	$U_{\text{вдв}}$	$U_{\text{эл}}$	$U_{\text{торс}}$
<i>ffefe</i>		$R_{22}R_1R_{11}RB_1$												0	-74,1	0,1	8,4
<i>fffee</i>		$R_{12}R_1R_{11}BB_1$												2,7	-68,4	-2,0	7,4
<i>ffffe</i>		$R_{12}R_1R_{11}RB_1$												5,8	-66,9	-0,8	7,8
<i>ffeef</i>		$R_{12}R_1B_{11}BR_1$												6,3	-65,5	-1,3	7,4
<i>fffef</i>		$R_{12}R_1R_{31}BR_3$												6,6	-70,4	0,1	11,2
<i>efeeef</i>	<i>ffff</i>	$R_{11}R_1R_2R_{21}R_{21}R_2R_{1222}$												7,2	-65,7	0	7,2
<i>eeeeef</i>		$B_{12}R_1B_{31}BR_1$												8,3	-64,2	-0,7	7,5
<i>feeeef</i>		$B_{12}B_1B_{11}BR_1$												8,5	-62,4	-2,9	8,1
<i>effef</i>		$R_{21}B_3B_{31}BR_1$												9,0	-64,2	0,2	7,3
<i>ffeee</i>		$B_{12}R_1R_{11}BR_1$												9,2	-63,6	-0,6	7,7
<i>feeff</i>		$R_{12}R_1R_{11}BB_1$															
<i>sefff</i>	<i>eeffff</i>	$R_{21}B_3B_{31}RR_1$												6,3	-66,8	-1,6	9,0
<i>ffeff</i>		$R_{12}B_3B_{31}HR_1$												7,3	-64,2	-2,1	7,9
<i>eefff</i>		$B_{21}B_1R_2R_{21}R_{21}R_2R_{1222}$												8,3	-67,7	0,4	9,9
<i>fffee</i>	<i>fffe</i>	$R_{32}R_2B_{21}RR_1$												8,3	-67,7	0,4	9,9
<i>fffee</i>		$B_{12}B_1B_{11}HR_1$												9,6	-64,8	0,5	8,1
<i>fffee</i>		$R_{12}R_1R_{11}BB_1$												6,4	-66,4	-0,2	7,2
<i>ffefe</i>		$R_{11}R_1R_2R_{21}R_{31}B_2R_{3322}$												8,3	-68,4	2,7	8,2
<i>fffee</i>		$R_{22}R_1R_{11}HB_1$												8,3	-68,4	2,7	8,2
<i>fffee</i>	<i>effff</i>	$R_{12}R_1B_{11}HR_1$												8,9	-64,8	-0,1	8,0
		$L_{31}R_1R_2R_{21}R_{21}R_2R_{1222}$												8,9	-64,8	-0,1	8,0

подуровней, определяемых конформационными состояниями переменного компонента. Распределение конформаций в каждом семействе по энергии в наибольшей мере зависит от числа стабилизирующих контактов между остатками лабильного и жесткого фрагментов. По-прежнему дисперсионные взаимодействия играют доминирующую роль.

Конформационному анализу октадекапептида His¹-Arg¹⁸ предшествовал детальный расчет пентадекапептида His¹-Asp¹⁵. Он был выполнен на основе структурных вариантов His¹-Arg¹², представленных в табл. III.29, и конформаций Arg¹²-Asp¹⁵ шейпов *eef*, *efe*, *eff*, *ffe* и *fff* с относительной энергией < 5,0 ккал/моль. В результате был выделен ограниченный набор низкоэнергетических конформаций пентадекапептида ($U_{\text{общ}} = 0-10,0$ ккал/моль), принадлежащих 17 шейпам пептидного скелета, которые и были использованы в расчете His¹-Arg¹⁸. Заслуживает быть отмеченным тот факт, что из четырех выгодных для додекапептида конформационных типов фрагмента Phe⁶-Arg¹² (*ffffff*, *eeffff*, *fffefe*, *efffff*) (см. табл. III.29) у пентадекапептида остаются лишь первые два. Тетрапептид Arg¹²-Asp¹⁵ в самых низкоэнергетических конформациях реализуется в α -спирали (*fff*), далее с разрывом от 6,2 до 9,4 ккал/моль следуют его структуры типа *efe* с формами B¹²-R¹³-B¹⁴-R¹⁵ и B¹²-B¹³-L¹⁴-B¹⁵ и типа *ffe* (R¹²-R¹³-B¹⁴-R¹⁵). В состав нулевых приближений октадекапептида вошли также конформации Asp¹⁵-Arg¹⁸ шейпов *efe*, *fee*, *eff*, *ffe* и *fff*. Данные о структурах His¹-Arg¹⁸ с величинами $U_{\text{общ}} \leq 10,0$ ккал/моль, полученные после минимизации энергии, приведены в табл. III.30.

Самые предпочтительные в отношении энергии и энтропии структуры His¹-Arg¹⁸ более чем на две трети являются жесткими образованиями, включающими около четырех витков α -спирали. Гексапептидная N-концевая часть последовательности остается столь же подвижной, как и у додекапептида и пентадекапептида. Из сопоставления данных табл. III.29 и III.30 следует, что с увеличением длины цепи значительно уменьшилось различие между энергией конформаций, отличающихся состоянием N-концевого гексапептида. Структуры другого ряда, которые у додекапептида и у пентадекапептида находились по энергии на втором месте, здесь перемещаются на третье. Выгодными становятся конформации с неспиральным участком Arg¹²-Arg¹⁸. Две из них с различными формами основной цепи шейпа *efeeff* у этого участка уступают глобальной конформации только 1,7 и 5,1 ккал/моль. Предпочтительность конформаций такого типа обусловлена появлением стабилизирующих взаимодействий между удаленными остатками, которые невозможны в чисто α -спиральных структурах. Очевидно, роль конформаций этого семейства может возрастать с увеличением длины цепи.

Выше были рассмотрены три этапа анализа пространственного строения октадекапептидного фрагмента секретина. Главным событием первого этапа явился расчет конформационных возможностей додекапептидного участка His¹-Arg¹², второго – пентадекапептидного His¹-Arg¹⁵ и, наконец, третьего – октадекапептидного участка His¹-Arg¹⁸ секретина. Результаты конформационного анализа этих фрагментов оказались столь определенными, а их преемственность по мере генерации цепи столь очевидной, что

Относительная энергия ($U_{\text{общ}}$) и энергетические вклады ван-дер-ваальсовых ($U_{\text{вдв}}$), электростатических ($U_{\text{эл}}$) и торсионных ($U_{\text{торс}}$) взаимодействий у оптимальных конформаций фрагмента His¹-Arg¹⁸ секретина

Шейп			Конформационная энергия, ккал/моль			
1-6	7-15	16-18	$U_{\text{общ}}$	$U_{\text{вдв}}$	$U_{\text{эл}}$	$U_{\text{торс}}$
ffefe	————— fffffff ————— fff		0	-117,3	3,2	14,3
fffee			0,4	-113,7	1,1	13,2
fffef			3,3	-115,9	2,3	17,1
ffef			3,6	-110,8	1,3	13,3
ffffe			4,3	-111,3	2,2	13,7
efefe			4,7	-111,1	2,8	13,1
eeefe			5,6	-109,4	1,8	13,3
feefe			5,7	-107,8	-0,4	14,0
effef			6,0	-109,6	2,5	13,2
ffeee			7,2	-108,8	2,7	13,6
ffefe	————— fffffef —————	eff	1,7	-111,8	1,7	12,0
ffefe		eff	5,1	-108,2	0,7	12,8
fffee		eff	7,1	-104,3	0,6	11,0
ffefe		ffe	8,0	-106,8	2,9	12,1
feeff	————— eeffffff —————	fff	6,7	-108,0	0,8	14,1
ffefe	————— fffffffe —————	fff	7,0	-111,8	4,5	14,6
fffee		fff	7,1	-108,4	2,0	13,6

полученные данные, как и логика самого исследования, могут быть легко представлены в наглядной форме (рис. III.31). Результаты последующего расчета показали, что в эту же схему вписываются также данные конформационного анализа докозапептидного фрагмента His¹-Leu²² и всей молекулы секретина. На рисунке продемонстрированы все типы (точнее, семейства) низкоэнергетических конформаций каждого фрагмента, их энергетические и вероятностные характеристики, генезис, наличие конформационно жестких и вариабельных участков; кроме того, по нему можно многое сказать о механизме спонтанного свертывания пептидной цепи молекулы и о путях перехода одного конформационного состояния в другое. Кратко проследим по представленной схеме основные результаты анализа фрагмента His¹-Arg¹⁸. Расчет додекапептида His¹-Arg¹² (первый этап) позволил выявить наличие у него двух участков, существенно отличающихся друг от друга по своим конформационным свойствам. Первый из них – N-концевой гексапептид (His¹-Phe⁶) характеризуется большой конформационной свободой (на рис. III.31 он обозначен буквами V_N в кружке). О способности фрагмента His¹-Phe⁶ принимать различное пространственное строение можно судить по данным, приведенным в табл. III.29 и III.30. Второй гексапептидный участок (Thr⁷-Arg¹²) додека-

риантов пентадекапептида. Из 17 конформаций His¹-Asp¹⁵ с величинами $U_{\text{общ}} < 10,0$ ккал/моль лишь три, имеющие высокую энергию, берут свое происхождение от другой группы додекапептидных конформаций, стоящей как в энергетической, так и в энтропийной шкале на втором месте. Следующие два семейства конформаций His¹-Arg¹², занимающие в этих шкалах третье и четвертое места, не имеют вообще ни одного своего представителя в наборе низкоэнергетических структур His¹-Asp¹⁵, иными словами, они оказались непродуктивными.

В принципе аналогичная тенденция обнаруживается при сопоставлении результатов расчета второго и третьего этапов, т.е. при сравнении предпочтительных конформаций пентадекапептида и октадекапептида. Лучший по энергии и самый представительный набор His¹-Arg¹⁸ α -спиральных конформаций V_N-f_{12} происходит от самого выгодного и многочисленного набора V_N-f_9 фрагмента His¹-Asp¹⁵. Семейство V_N-f_{6efe} , впервые образовавшееся у пентадекапептида, разбивается при дальнейшем удлинении цепи на две тонкие ветви – $V_N-f_{6efeef_2}$ и $V_N-f_{6efef_2e}$, первая из которых, однако, содержит две низкоэнергетические конформации с различными формами основной цепи (1,7 и 5,1 ккал/моль) (см. табл. III.30). Наименее выгодные у His¹-Asp¹⁵ варианты V_N-f_{8e} и $V_N-e_{2f_7}$ остаются таковыми и у их производных $V_N-f_{8ef_3}$ и $V_N-e_{2f_{10}}$ фрагмента His¹-Arg¹⁸. Следовательно, процесс формирования нуклеации, начавшийся с участка Thr⁷-Arg¹², продолжает распространяться на все большую часть последовательности секретина.

Завершающие этапы конформационного анализа гормона, излагаемые ниже, включают рассмотрение конформационных возможностей пентапептида Arg¹⁸-Leu²², а переход от His¹-Leu²² к молекуле секретина – двух пентапептидов Gln²⁰-Gln²⁴, Leu²²-Val²⁷NH₂ и октапептида Gln²⁰-Val²⁷NH₂.

Последний шаг в изучении пространственной структуры гормона, в конечном счете, основывался на оптимальных конформациях докозапептида His¹-Leu²² с энергией $U_{\text{общ}} \leq 10,0$ ккал/моль и на отмеченных только что конформациях октапептида Gln²⁰-Val²⁷NH₂ с энергией $U_{\text{общ}} \leq 8,0$ ккал/моль (см. табл. III.30). Всего было рассмотрено 84 структурных варианта гептакозапептида. Если иметь в виду найденные низкоэнергетические оптимальные состояния молекулы, к которым до некоторой степени условно относим ее конформации с величинами $U_{\text{общ}}$ в интервале 0–10,0 ккал/моль, то основной результат решения прямой структурной задачи секретина может быть сформулирован следующим образом: пространственное строение гормона в условиях полярной среды представляет собой два семейства конформаций $V_N-f_{6efeef_7}-V_C$ и $V_N-f_{17}-V_C$, отличающихся друг от друга состоянием центрального тетрапептидного участка Arg¹²-Leu¹³-Arg¹⁴-Asp¹⁵ (рис. III.31, табл. III.31); V_N и V_C – являются переменными N- и C-концевыми фрагментами, состоящими соответственно из шести и пяти аминокислотных остатков. Они могут принимать различные конформационные состояния, мало отличающиеся у свободной молекулы по энергии. Фрагменты V_N и V_C разделены конформационно жестким участком последовательности Thr⁷-Leu²², который может находиться в одной из двух практически изоэнергетических пространствен-

Таблица III 31

Относительная энергия ($U_{\text{общ}}$) и энергетические вклады ван-дер-ваальсовых ($U_{\text{вдв}}$), электростатических ($U_{\text{эл}}$) и торсионных ($U_{\text{торс}}$) взаимодействий оптимальных конформаций фрагмента секретина

Шейп			Конформационная энергия, ккал/моль			
1-6	7-22	23-27	$U_{\text{общ}}$	$U_{\text{вдв}}$	$U_{\text{эл}}$	$U_{\text{торс}}$
ffefe	fffffefefefffff	efef	0	-188,9	10,1	19,1
ffefe		efef	8,5	-180,1	9,5	19,4
ffefe		ffff	1,2	-188,4	10,2	19,7
ffefe		ffff	3,5	-185,3	9,1	19,9
ffefe		efee	4,2	-182,8	10,4	18,1
fffee		efef	4,4	-181,6	8,3	18,0
fffee		ffff	6,0	-181,6	8,9	19,0
fffee		efee	7,7	-180,8	9,9	20,0
ffefe		ffff	1,6	-192,2	11,9	22,2
ffefe		efef	6,5	-188,3	12,6	22,2
ffefe	ffffffffffffff	efee	6,7	-186,2	12,3	22,1
fffee		ffff	1,7	-188,9	9,5	21,4
fffee		efef	6,1	-184,6	10,3	20,7
fffee		efee	6,9	-182,5	10,0	21,0
fffef		ffff	3,9	-190,9	11,1	25,2
fffef		ffff	4,6	-185,1	9,9	21,3
ffffe		ffff	5,0	-186,3	11,1	21,7
efeef		ffff	5,3	-185,8	11,4	21,1
feef		ffff	5,9	-182,8	8,1	22,1
effef		ffff	6,1	-184,5	10,9	21,3
eeef	fffffefffff	ffff	6,9	-183,0	9,9	21,5
feef		ffff	8,3	-181,6	9,1	22,2
fffee		ffff	8,5	-180,8	8,9	21,9
ffefe		ffff	8,7	-184,8	12,0	23,0

ых форм. Одна форма (f_{17}) содержит около пяти витков α -спирали, а другая (f_6 efef f_7) представляет собой два α -спиральных участка (f_6, f_7), соединенных между собой нерегулярной цепью (efef), которая может быть реализована двумя различными способами (BRBBR и BBLBR).

Переход между двумя практически эквивалентными по энергии структурами f_{17} и f_6 efef f_7 , по-видимому, имеет строго кооперативный характер, поскольку любое единичное изменение конформационного состояния одного из остатков на участке Arg¹²-Asp¹⁵ сопровождается резким увеличением энергии. Например, наименьшее изменение энергии, которое происходит только при переходе R-формы остатка Arg¹⁴ в В-форму, составляет более 8 ккал/моль. Кооперативность обращения одной формы в другую неувидительна, так как процесс $V_N-f_{17}-V_C \leftrightarrow V_N-f_6$ efef f_7-V_C затрагивает геометрию тетрапептидного фрагмента Arg¹²-Leu¹³-Arg¹⁴-Asp¹⁵, содержащего три остатка с заряженными боковыми цепями. Конформационная энергия в этом случае оказывается чувствительной не только к взаимному расположению остатков Arg¹², Arg¹⁴ и Asp¹⁵ внутри данного фрагмента, но и к ориентации их по отношению к остальной части последовательности, также содержащей заряженные группы.

На всех стадиях расчета при анализе коротких и длинных участков последовательности мы руководствовались исключительно энергией внутримолекулярных взаимодействий валентно-несвязанных атомов. Рассматривая каждый раз большое количество вариантов, мы также постоянно стремились найти и отобрать для последующего счета такие структуры, в которых реализовывалось бы максимальное число взаимосогласованных друг с другом контактов между боковыми цепями, элементами основной цепи и между первыми и вторыми. В этой связи интересны результаты теоретического анализа, касающегося конформационных состояний боковых цепей полярных аминокислотных остатков. Так, расчет показал, что боковые цепи четырех остатков аргинина, т.е. всех, имеющих в последовательности секретина, ориентированы в самых низкоэнергетических пространственных структурах молекулы во внешнюю среду. Иными словами, они автоматически приняли положения, самые выгодные с точки зрения межмолекулярных взаимодействий гормона с водой, что не учитывалось в расчете. В то же время эти положения не обеспечивают образования эффективных дисперсионных внутримолекулярных взаимодействий боковых цепей остатков Arg, что, казалось бы, свидетельствует о неудовлетворительности структуры с точки зрения учитываемых в расчете внутримолекулярных взаимодействий. В действительности противоречие здесь кажущееся и найденные конформации секретина оптимальны в отношении всех видов взаимодействий.

Теоретический конформационный анализ секретина привел к такой структурной ориентации молекулы, которая не исключает реализацию гормоном ряда разнообразных функций, требующих строго специфических взаимодействий с различными рецепторами. Выделены два вероятных семейства низкоэнергетических структур молекулы с точностью до значений двугранных углов вращения (или координат всех атомов) и величин энергии невалентных взаимодействий каждой структуры. Определение истинной иерархии найденных оптимальных конформаций секретина

сделать, однако, нельзя из-за неопределенности условий функционирования каждой из них. Для секретина отсутствуют данные рентгеноструктурного анализа. Поэтому пока невозможно сделать прямое сопоставление результатов теории и эксперимента. Можно лишь сравнивать найденные конформации секретина с известной кристаллографической структурой его гомолога – глюкагона, 29-членного пептидного гормона [244]. Т. Бланделл и С. Вуд – авторы рентгеноструктурного исследования этой молекулы (разрешение 3,0 Å), отмечают реализацию на участке 6–27 последовательности α -спирали и конформационную подвижность N-концевого гексапептида, идентичного N-концевому участку секретина. В кристалле глюкагон является гомодимером, в связи с чем его структура, особенно на N- и C-концевых участках, хотя бы частично должна быть детерминирована межмолекулярными взаимодействиями. Склонность к самоассоциации была обнаружена и у молекулы секретина в водном растворе [238], что проявляется, однако, в меньшей степени, чем у глюкагона; она обнаруживается только при высоких концентрациях и у свободного фрагмента 7–27. Сопоставление структуры глюкагона с расчетными конформациями секретина выявило количественное совпадение геометрии центральных α -спиральных участков 7–22 обеих молекул. Следуя из теоретического анализа, конформационная подвижность гормона согласуется с наблюдаемыми изменениями его спектров КД при укорочении цепи и вариации внешних условий [232, 239].

Глава 14

ПРИНЦИПЫ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПРИРОДНЫХ ОЛИГОПЕПТИДОВ

В 10–13 главах были обсуждены результаты теоретического конформационного анализа достаточно представительной группы олигопептидов. Более полный перечень природных пептидов и их синтетических аналогов, пространственное строение которых рассмотрено автором данной монографии и сотрудниками до начала 1995 г., приведен в табл. III.32. Напомним, что наш интерес к пространственной структуре сравнительно низкомолекулярных пептидов связан, прежде всего, с белками, изучение структурной организации которых требовало получения детального представления о характере и значении средних межостаточных взаимодействий и умения давать им правильную количественную оценку. Согласно бифуркационной теории (см. разд. 2.1) сборка белка начинается с образования на локальных олигопептидных участках аминокислотной последовательности конформационно жестких нуклеаций, разделенных лабильными участками. Их формирование должно иметь много общих черт, если почти буквально не совпадать, с процессом, особенно на первых его стадиях, свертывания белковой цепи. Поэтому априорный расчет трехмерной структуры белка, математическое моделирование механизма спонтанной, быстрой и безошибоч-

**Природные и синтетические пептиды,
изученные методом теоретического и конформационного анализа**

№ п/п	Природный пептид	Число амино- кислотных остатков	Синтетический аналог	Литературный источник
1	БПП ₅ *	5	[Gln ²]-, [Pro ³]-, [Val ⁴]-, [Pro ⁴]-, [Lys ²]-, [N-MeAla ⁴]-, [Ala ² , Pro ³]-, [Lys ² , Pro ⁴]-, [Phe ³ , Pro ⁴]-пентапептид	[1, 245–248]
2	БПП ₉	9		[4]
3	БПП ₁₀	10		[5, 6, 249]
4	β-Казоморфин-5	5		[250]
5	Тимопептин	5	[Gly ³]-, [Glu ³]-, [Lys ¹ , Arg ²]- тимопептин	[251]
6	Окситоцин	9		[106]
7	Вазопрессин	9		[107]
8	Вазотоцин	9		[107]
9	Мезотоцин	9		[108]
10	[Asp ¹]-ангиотензин I	10		[252]
11	[Asp ¹]-ангиотензин II	8	[Pro ²]-, [Ala ³]-, [Pro ³]-, [Ala ⁵]-, [Pro ⁵]-, [Ala ⁸]-, [Tyr ⁸]-, [Ile ⁸]-, [des-Phe ⁸]- ангиотензин II	[32, 252]
12	Ангиотензин III	7		[252]
13	[Asn ¹]-ангиотензин II	8		[252]
14	Антаманид	10		[253, 254]
15	Аламин	18		[85–89]
16	Тертиагин	21		[100]
17	MCD-пептид	22		[101]
18	Инсектотоксин I ₁	36		[103]
19	Грамицидин А			[255]

№ п/п	Природный пептид	Число амино- кислотных остатков	Синтетический аналог	Литературный источник
20	Leu-энкефалин	5	[Ala ²]-, [D-Ala ²]-, [Ala ³]-, [D-Ala ³]-, [Ala ² , Ala ³]-, [Ala ² , D-Ala ³]-, [D-Ala ² , D-Ala ³]-, [Ala ² , N-MePhe ⁴]-, [Ala ² , N-MeLeu ⁵]-, [Arg ⁶]-, [D-Ala ² , Arg ⁶]-, [D-Ala ² , Gly ⁵ , Arg ⁶]-, [D-Ala ² , Ala ⁵ , Arg ⁶]-, [D-Ala ² , Ala ⁵ , Lys ⁶]-, [D-Ala ² , Ala ⁵ , Asn ⁶]-, [D-Ala ² , Ala ⁵ , Gln ⁶]-, [D-Ala ² , Ala ⁵ , His ⁶]-, [D-Ala ² , N-MePhe ⁴ , Arg ⁶]-Leu-энкефалин	[157]
21	Met-энкефалин	5	[Ala ²]-, [D-Ala ²]-, [Ala ³]-, [D-Ala ³]-, [Ala ² , Ala ³]-, [Ala ² , D-Ala ³]-, [D-Ala ² , Ala ³]-, [D-Ala ² , D-Ala ³]-, [Ala ² , N-MePhe ⁴]-, [Ala ² , N-MeMet ⁵]-, [D-Ala ² , Pro ⁵]-Met-энкефалин	[157]
22	α-Эндорфин	16		[158]
23	γ-Эндорфин	17		[158]
24	δ-Эндорфин	19		[158]
25	β-Эндорфин	31		[159]
26	α-Меланотропин	13		[163]
27	β-Меланотропин быка	18	[Ala ¹⁰]-, [D-Ala ¹⁰]-, [Pro ¹⁰]-, [Ala ¹³]-, [Pro ¹³]-, [N-MeTrp ¹²]-β-меланотропин	[31]
28	β-Меланотропин человека	22		[256]
29	γ-Меланотропин	12		[257]
30	ОП ₈ **	8	[Ala ²]-, [D-Ala ²]-, [Ala ³]-, [D-Ala ³]-, [N-MeMet ⁵]-, [N-MeArg ⁶]-, [Ala ⁷]-, [D-Ala ⁷]-октапептид	[162]
31	α-Неоэндорфин	10		[161]
32	β-Неоэндорфин	9	[Ala ²]-, [D-Ala ²]-, [Ala ³]-, [D-Ala ³]-β-неоэндорфин	[161]

№ п/п	Природный пептид	Число амино- кислотных остатков	Синтетический аналог	Литературный источник
33	Адренорфин	8	[Ala ²]-, [D-Ala ²]-, [Ala ³]-, [D-Ala ³]-, [N-Me Met ⁵]-, [N-Me Arg ⁶]-, [N-Me Arg ⁷]-, [N-Me Val ⁸]- адренорфин	[164]
34	Пептид δ-сна	9	[D-Ala ³]-, [Pro ⁴]-, [Pro ⁶]-, [Pro ⁷]-, [Asn ⁵]-, [Tyr ⁷]-, [Val ² , Val ⁸]- пептид δ-сна	[160, 258]
35	Липотропный актон соматотропина	14	[Arg ³]-, [Pro ² , Lys ³ , Glu ⁴]-актон	[259]
36	Секретин	27	[Asn ²]-, [Gln ⁹]-, [Pro ¹³]-, [N-MeLeu ¹³]-, [Asn ¹⁵]-, [Ala ⁴ , Pro ¹³]-, [D-Ala ⁴ , Pro ¹³]-, [Pro ¹³ , D-Ala ²⁵]-, [Pro ¹³ , Ala ²⁵ , Pro ²⁶]-, [Ala ⁴ , Pro ¹³ , D-Ala ²⁵]-, [D-Ala ⁴ , Pro ¹³ , D-Ala ²⁵]-, [D-Ala ⁴ , Pro ¹³ , Ala ²⁵ , Pro ²⁶]-, [Ala ⁴ , Pro ¹³ , Ala ²⁵ , Pro ²⁶]-секретин	[215, 260–262]
37	Фрагмент нейротоксина II	23	[Pro ¹⁸]-, [Met ¹ , Pro ¹⁸ ,]-, [Thr ¹¹ , Gln ¹⁵ , Pro ¹⁸]-, [Met ¹ , Ile ² , Ile ¹⁴ , Pro ¹⁸]-, [Met ¹ , Ile ² , Arg ¹¹ , Ile ¹⁴ , Pro ¹⁸]-β-нейротоксин	[263]
38	Панкреатический трипсиновый ингибитор	58		[264]

* БПП – брадикининпотенцирующий пептид.

** ОП – опиоидный пептид.

бочной сборки белковой последовательности в физиологически активную конформацию и понимание причин возникновения и эволюционного развития гетерогенных полипептидов невозможны без установления принципов структурной организации менее высокомолекулярных пептидов и без разработки соответствующего метода расчета средних взаимодействий, уникальных в каждом конкретном случае. Между эволюционно отобранными олиго- и полипептидами нет четко очерченных границ или каких-либо принципиальных различий. Следовательно, физическая теория и расчетный метод конформационного анализа более простых молекул должны являться естественными составными частями физической теории и расчетного метода конформационного анализа более сложных молекул того же химического типа.

Знание пространственного строения и динамических конформационных свойств природных олигопептидов представляет также большой самостоятельный интерес. Оно необходимо для исследования молекулярных механизмов узнавания, стимулирования, регуляции и т.д., иными словами, для выяснения структурно-функциональной организации многочисленных пептидных гормонов, медиаторов, модуляторов, антибиотиков, ионофоров и других низкомолекулярных физиологически активных пептидов. Априорный расчет конформационных возможностей олигопептидов приобретает здесь особый смысл, поскольку именно теоретический подход только и может (а следовательно, и должен) стать основой строгого решения необычной по своей общности, научной и практической значимости проблемы установления зависимости между структурой и функцией пептидов (подробно см. гл. 18).

Ближайшая задача заключается в обобщении результатов конформационного анализа рассмотренных и представленных в табл. III.32 природных олигопептидов. Для достижения этой цели нельзя было привлечь по соображениям исключительно объективного характера все имеющиеся литературные данные (см. ниже), и мы были вынуждены ограничиться выбором в качестве базовых отмеченных соединений. Это обусловлено рядом причин. Во-первых, расчет пространственного строения перечисленных в таблице пептидов во всех случаях строился на основе единой теории. Во-вторых, в их конформационном анализе использовался один и тот же расчетный метод, который исходит из естественной классификации пептидных структур и охватывает все возможные состояния любой аминокислотной последовательности. В-третьих, в расчете соединений, перечисленных в табл. III.32, использовались одни и те же потенциальные функции ван-дер-ваальсовых, электростатических и торсионных взаимодействий и водородных связей, одинаковая система их параметризации и единая валентная геометрия основных и боковых цепей аминокислотных остатков. Таким образом, выводы о характерных особенностях структурной организации молекул олигопептидов в этом случае можно формулировать, опираясь на унифицированный во всех своих деталях подход и на результаты исследования представительного набора объектов. При полумэмпирическом характере расчетной процедуры и потенциальных функций такое теоретическое и методическое единство является необходимым условием для корректного обобщения результатов, выявления общих закономерностей

тей в структурной организации олигопептидов и формулировки далеко идущих положений. К этому, безусловно, следует добавить еще одно условие – соответствие результатов теории и эксперимента. Нами уже были рассмотрены причины принципиального и методического характера, объясняющие не совсем обычную для физических исследований ситуацию, когда реальность расчета, за редким исключением, не может быть подтверждена прямым сопоставлением теоретических результатов с опытными данными. Выше обсуждались возможные в данном случае подходы (см. гл. 10), которые и были использованы нами для апробации предложенных теории и физической модели структурной организации олигопептидов, а также всех деталей расчетной схемы.

Олигопептиды, пространственное строение которых было изучено теоретически другими авторами, перечислены в табл. III.33. Такие исследования проводились, в основном, тремя группами исследователей: С.Г. Галактионовым и сотрудниками, Г. Шерагой и сотрудниками, Дж Де-, Козном и сотрудниками. Большая часть изученных соединений (1–15) – это пептиды, содержащие не более десяти аминокислотных остатков. Пространственное строение ряда молекул (пептиды 2, 3, 5, 8, 9, 10) было рассчитано сотрудниками сразу двух или трех групп; строение некоторых молекул пептидов (8, 9, 10, 13, 14, 17) исследовалось одновременно в группах Галактионова и автора данной монографии. Следовательно, появилась возможность для сопоставления результатов расчета, если не с экспериментом, то хотя бы друг с другом. Сравнение данных конформационного анализа, полученных для ангиотензина II, окситоцина, вазопрессина, энкефалинов и α -меланотропина, уже было сделано (см. гл. 9–12).

Начнем обсуждение с одного из самых простых физиологически активных олигопептидов – тиролиберина ($\text{Glu}^1\text{-His}^2\text{-Pro}^2\text{NH}_2$), конформационные возможности которого теоретически рассматривались Г. Шерагой и соавт. [268, 269], Дж. Викаром и соавт. [270], М. Гудманом и соавт. [267], а также Дж. Джорджем и Л. Клером [271] и Р. Фларри и соавт. [272]. В последних двух работах использовались квантовохимические методы (расширенный метод Хюккеля и CNDO/2). Рассчитанные значения конформационных параметров глобальных конформаций тиролиберина сопоставлены в табл. III.34. Обращает на себя внимание практически полное несовпадение результатов всех выполненных расчетов этого пептида. Различия, причем значительные, касаются не только численных значений всех углов внутреннего вращения, но и их положений в низкоэнергетических областях конформационной карты $\phi - \psi$, т.е. форм основной цепи остатков. Согласно расчетным данным авторов [268–271], центральный остаток His имеет форму В; в работе же [267] он определен в R-состоянии, которое для остатка, предшествующего Pro, является высокоэнергетичным; рассчитанные в работе [272] значения углов ϕ , ψ того же His лучше всего отвечают на карте $\phi - \psi$ области L. По-разному во всех случаях ориентированы остатки ProNH_2 и Glu^1 , а также боковая цепь His. Отсутствует совпадение, даже качественное, результатов, полученных Т. Ямадой и соавт. [273] и С. Г. Галактионовым и соавт. [48] в анализе другого простого пептида – тетрагастрина ($\text{AcTrp}^1\text{-Met}^2\text{-Asp}^3\text{-Phe}^4\text{NH}_2$), являющегося C-концевым фрагментом гастринового гормона. В

**Природные и синтетические пептиды,
изученные методом теоретического конформационного анализа**

№ п/п	Природный пептид	Число амино- кислотных остатков	Синтетический аналог	Литературный источник
1	Глутатион	3		[181]
2	Меланостатин	3		[265, 266]
3	Тиролиберин	3	[N- MeHis ²]-тиролиберин	[267–272]
4	Тафцин	4		[48]
5	Тетрагастрин	4		[48, 273]
6	Проктолин	5		[274]
7	Вазоактивный пептид	5		[275]
8	Мет-энкефалин	5	[D- Ala ²]-, [Ala ²]-, [D- Ala ³]-, [D- Ala ² , N- Me Phe ⁴]-, [D- Met ² , Pro ⁵]-, [D- Ala, N- MeMet ⁵]- энкефалин	[180–182, 190, 196, 197, 269, 276]
9	Leu-энкефалин	5	[D- Arg ²]-, [D- Ala ² , D- Leu ⁵]- энкефалин	[48, 181, 269, 276]
10	Ангиотензин II	8	[Gly ¹]-, [Gly ²]-, [аза- Val ³]-, [аза- Tyr ⁴]-, [аза- Val ⁵]-, [аза- His ⁶]-ангиотензин II	[22, 47–50, 274, 276, 277]
11	Ксенопсин	8		[278]
12	Брадикинин	9	[des- Arg ⁹]-, [D- Phe ⁶ , des- Arg ⁹]- брадикинин	[48, 279]
13	Окситоцин	9		[48, 114]
14	Вазопрессин	9		[48, 114]

№ п/п	Природный пептид	Число амино- кислотных остатков	Синтетический аналог	Литературный источник
15	Люлиберин	10	[<i>D</i> -His ² , <i>D</i> -Trp ³]-, [<i>D</i> -His ²]-, [<i>D</i> -His ² , Pro ³]-, [<i>D</i> -His ² , Leu ³]-люлиберин	[48, 280]
16	Вещество Р	11		[48]
17	α-Меланотропин	13		[48]
18	Соматостатин	14		[48]
19	Сигнальный N-концевой пептид иммуноглобулина	16		[282]
20	N-концевой фрагмент мелиттина	20		[283–286]
21	Аламетицин	18		[289]
22	Грамицидин S	10		[292–297]

**Рассчитанные значения конформационных параметров
глобальных конформаций тиролиберина (литературные данные)**

Аминокислотный остаток	Конформационный параметр	Значение конформационного параметра, град				
		[249,250]	[251]	[248]	[252]	[253]
<Glu ¹	ψ	-45	15	134	165	175
His ²	ϕ	-156	-90	-54	-60	4
	ψ	154	75-120	-47	120	80
	χ_1	60	-60	-23	180	50
	χ_2	82	90	171	60	50
Pro ³ NH ₂	ψ	168	75	7	150	30

первой работе допущено необоснованное упрощение конформационной задачи, заключавшееся в предложении о том, что самой выгодной формой основной цепи является α -спираль. Поэтому выбор всех нулевых приближений боковых цепей для минимизации энергии был осуществлен для единственной фиксированной α -спиральной формы пептидного скелета с помощью сечений потенциальной поверхности χ_1 - χ_2 . Более объективный и детальный анализ конформационных возможностей тетрагастринина проведен в работе [48]. В результате авторами получен набор из 22 структурных вариантов основной цепи, которые при оптимальном расположении боковых цепей обладают относительной энергией $U_{\text{общ}} < 7,5$ ккал/моль. Ни одна из этих структур не имела α -спиральной формы (R-R-R-R), считавшейся самой предпочтительной в работе [273]. Напротив, найденная глобальная конформация молекулы обладает полностью развернутой структурой пептидного скелета (B-B-B-B), а энергия всех других конформаций увеличивается с ростом отклонения цепи от вытянутой формы.

Расчетные исследования пространственного строения Met- и Leu-энкефалинов проводились неоднократно (см. табл. III.33), но как уже было отмечено ранее, отсутствовало единое мнение о конформационных возможностях этих простейших лигандов опиоидных рецепторов. Г. Шерага и соавт. [181] при расчете Met-энкефалина в качестве исходных приближений выбрали регулярные структуры и различные формы β -изгибов основной цепи, а также низкоэнергетические конформационные состояния монопептидов, ди-(Phe⁴-Met⁵) и три-(Tyr¹-Gly³) пептидных фрагментов. Все регулярные структуры гормона, в том числе α -спираль, имели высокую энергию. Самыми предпочтительными оказались конформации с формой B-N-R-B-B (шейп *ffe*). Они имеют β -изгиб на участке Gly³-Phe⁴ и водородную связь между OH-группой боковой цепи Tyr¹ и карбонилем основной цепи Gly³ или Phe⁴. Боковые цепи остатков метионина и фенилаланина ориентированы в среду и конформационно свободны. В более поздних исследованиях Г. Шераги и соавт. [188-190] лучшая по энергии конформация имела форму основной цепи B-N-B-B-B (шейп *ffee*). Дж. Де-Козн и

соавт. [167, 180] при исследовании конформационных возможностей того же Met-энкефалина использовали иной подход. Нулевыми приближениями служили комбинации двугранных углов, отвечающих различным типам свернутых и развернутых форм дипептидов, исследованных ранее Э. Ролстоном, Дж. Де-Козном и Р. Вальтером [265]. Всего было рассчитано 400 конформаций основной цепи. Для каждого варианта из этого набора был оценен вероятностный фактор путем учета конформационных состояний боковых цепей. При поиске окончательных структур энкефалина минимизация энергии по независимым геометрическим параметрам не проводилась. В отличие от результатов [181] сделан вывод о примерно равной стабильности свернутых и развернутых структур.

Более прецизионный конформационный анализ энкефалина осуществлен С.Г. Галактионовым и соавт. [48]. Начальные значения углов внутреннего вращения ϕ , ψ основной цепи были взяты из расчета соответствующих монопептидов. Предварительная оценка подвижности основной цепи проводилась путем анализа модельного тетрапептида Ala-Gly-Gly-Ala; положения боковых цепей Tyr¹ и Phe⁴ находились из расчета трипептидных фрагментов Tyr¹-Gly³, Gly²-Phe⁴ и Gly³-Met⁵. После минимизации энергии по всем двугранным углам ϕ , ψ и χ получено около 20 структурных вариантов с величинами $U_{\text{общ}} < 7,0$ ккал/моль. Было показано, что глобальная конформация B₁₁₁HBV₂₁B₃₂₂ имеет основную цепь шейпа *ffee* с поворотом на участке Gly²-Gly³ и сближенными N- и C-концевыми остатками. Многие низкоэнергетические конформационные состояния обладали формой пептидной цепи свернутого типа с эффективно взаимодействующими ионогенными группами Tyr¹ и Met⁵. Ф. Момани [182] в расчете Met-энкефалина отмечает высокую чувствительность конформационной энергии к величинам зарядов концевых групп. Однако полученные им результаты не согласуются с данными других авторов. Так, лучшая из рассчитанных Момани для свободной молекулы гормона структура не входила в наборы предпочтительных конформаций, найденных Де-Козном и соавт. [167, 180] и Галактионовым и соавт. [48]. Структура с B-N-R-B-B-формой основной цепи, предложенная Шерагой и соавт. [181], попадала в число низкоэнергетических конформационных вариантов, полученных другими авторами, проигрывая глобальным конформациям ~ 1,0 ккал/моль [167, 180] и 5,8 ккал/моль [48].

Исследование пространственного строения декапептидного гормона люлиберина (<Glu¹-His²-Trp³-Ser⁴-Tyr⁵-Gly⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁸-Gly¹⁰NH₂) впервые было предпринято Момани [280]. Предварительно им рассматривались конформационные возможности свободных фрагментов <Glu¹-Gly⁶ и Gly⁶-Gly¹⁰NH₂, исходные приближения которых автором оценивались визуально с помощью атомных моделей. Комбинации низкоэнергетических конформаций участков <Glu¹-Gly⁶ и Gly⁶-Gly¹⁰NH₂, не приводящие в моделях к наталкиванию атомов, составили 143 структурных варианта декапептида. После минимизации их энергии в интервал 0-15,0 ккал/моль попали семь оптимальных конформаций, причем две из них особенно резко выделяются по стабильности. В более строгом исследовании пространственной структуры люлиберина авторами [48] были предварительно рассмотрены конформационные возможности перекрывающихся фраг-

ментов $\text{Glu}^1\text{-Tyr}^5$, $\text{Ser}^4\text{-Pro}^9$ и $\text{Gly}^6\text{-Gly}^{10}\text{NH}_2$. Принятая схема расчета свидетельствует о том, что в отличие от работы Момани [280] здесь были изучены конформационные возможности центральной части молекулы. Найденные в [48] для люлиберина предпочтительные конформации имели формы основной цепи, совпадающие на участке $\text{Tyr}^5\text{-Pro}^9$. Следовательно, структура этой части пептидной цепи в основном детерминируется за счет средних взаимодействий, и фрагмент $\text{Tyr}^5\text{-Pro}^9$ является конформационно жесткой нуклеацией. Результаты двух расчетов отличаются между собой; наиболее существенные различия, затрагивающие форму и шейп пептидного скелета, касаются N-концевого тетрапептидного участка цепи. В целом, оптимальные структуры Момани менее компактны. Предложенные им самые выгодные конформации люлиберина уступали по энергии $\sim 20,0$ ккал/моль глобальной конформации, рассчитанной Галактионовым и сотр.

Дж. Де-Козн и Э. Ролстон [47] провели теоретический конформационный анализ октапептидного гормона ангиотензина II ($\text{Asn}^1\text{-Arg}^2\text{-Val}^3\text{-Tyr}^4\text{-Val}^5\text{-His}^6\text{-Pro}^7\text{-Phe}^8$). В основе расчета лежал разработанный авторами [265] метод "стереоалфавитного" приближения. На первом этапе было рассмотрено $> 10^5$ вариантов укладки пептидной цепи в модельном соединении $(\text{Ala})_6\text{-Pro}^7\text{-Ala}$ (без учета L-формы остатков). Показано, что свернутые формы пептидного скелета предпочтительнее развернутых. В интервал 0–8 ккал/моль попало ~ 1500 форм. Для каждой из них рассмотрено $\sim 10^5$ различных конформеров по боковым цепям. При исследовании взаимодействий боковых цепей между собой и с пептидным скелетом конформационные параметры χ изменялись через 30° . Низкоэнергетические конформации ангиотензина минимизировались по 30 двугранным углам молекулы. Десять структур попали в интервал 0–5 ккал/моль. К исследованию пространственного строения ангиотензина II не один раз обращались С.Г. Галактионов и сотрудники [22, 48, 50]. В расчете конформационных возможностей молекулы особое внимание уделялось взаимодействиям звеньев основной цепи фрагмента $\text{Tyr}^4\text{-Phe}^8$. Поиску оптимальных конформаций ангиотензина предшествовал анализ возможных форм пептидного скелета аланинового аналога гептапептидного фрагмента $\text{Arg}^2\text{-Phe}^8$. После минимизации энергии по всем двугранным углам учитывался вклад гидратации, который, однако, мало повлиял на величины относительной энергии. В интервал 0–10,0 ккал/моль попали конформации пяти различных форм основной цепи. Все они квазициклически с ионной связью между гуанидиновой группой Arg^2 и C-концевой карбоксильной группой Phe^8 . Результаты [48] заметно отличались от обсуждавшихся до этого данных Де-Козна и Ролстона [47], однако и те и другие не противоречат имеющимся экспериментальным наблюдениям. С. Премила и Б. Мэгре [281] для исследования конформационных возможностей ангиотензина использовали метод Монте Карло. Расчет указал на предпочтительность свернутых форм пептидного остова, из которых наиболее низкоэнергетической оказалась структура BBRRBLBB, не значащаяся в наборах низкоэнергетических конформаций С.Г. Галактионова и соавт. [48] и Де-Козна и Ролстона [47]. Любопытно, что данные Премила и Мэгре также согласовывались с экспериментом. Таким образом, имеет место ситуация, когда существенно отличающиеся между собой результаты ряда независимых

расчетов пространственного строения одного и того же олигопептида не противоречат данным широкого круга экспериментальных работ для этого соединения. Это свидетельствует лишь о малой чувствительности и недостаточных при решении задач такой сложности интерпретационных возможностях физико-химических методов.

Среди исследованных в литературе олигопептидов есть несколько сравнительно высокомолекулярных объектов. Самым крупным из них является N-концевой фрагмент мембранного глобулярного белка мелиттина (20 аминокислотных остатков). Впервые его конформационные возможности с помощью фрагментарного подхода были рассчитаны Шерагой и соавт. [283]. Найденные две низкоэнергетические структуры напоминали друг друга и состояли в основном из $\sim 4,5$ остатков α -спирали. Похожие конформации фрагмента мелиттина были получены позднее и в работах [284–286] при использовании других расчетных методов. Результаты теоретического анализа качественно согласуются с данными рентгеноструктурного анализа [287] и ЯМР-спектроскопии [288] о пространственном строении мелиттина в кристалле и растворе.

В недавнем расчете октадекапептида аламетицина С.Г. Галактионовым и Г. Маршаллом [289] предпринята попытка учесть влияние электрического поля на конформацию молекулы, находящейся в водно-липидном слое, путем последовательной подгонки структуры к комплементарному ей профилю поверхности [290, 291]. Результат может представлять интерес для изучения стимулированных аламетицином процесса связывания с мембраной и механизма передачи сигнала.

Конформационный анализ циклического декапептида грамицидина S проводился рядом исследователей [292–297]. В табл. III.35 значения двугранных углов ϕ , ψ основной цепи молекулы, рассчитанные М. Дигертом и соавт. [292], П. Де Сантисом и А. Ликвори [294], Ф. Момани и соавт. [296], Р. Скоттом и соавт. [297], сопоставлены с результатами исследований спектров ЯМР, КД, ИК [298, 299] и данными рентгеноструктурного анализа [300]. За одним исключением [296], между теоретическими и экспериментальными моделями нет значительных различий. И те и другие привели к структуре грамицидина S, состоящей из двух β -складчатых листов, соединенных двумя β -изгибами и скрепленных четырьмя поперечными водородными связями. По форме основной цепи приведенные в табл. III.35 конформации находятся в удовлетворительном согласии с кристаллической структурой гидратированного комплекса грамицидина S с мочевиной [301], а также данными двумерной ЯМР-спектроскопии [302].

Среди обсуждаемых исследований конформаций олигопептидов (см. табл. III.33) заметно выделяются работы С.Г. Галактионова и сотрудников своей последовательностью и направленностью на установление общих закономерностей между структурой и функцией низкомолекулярных природных пептидов. Достоинство этих работ заключено также и в методической части расчетов, их систематичности и использовании единого алгоритма, что облегчает анализ теоретических основ используемого подхода и оценку полученных результатов. Алгоритм С.Г. Галактионова и соавт. [22] строится на представлении конформационной энергии пептида как суммы энергии перекрывающихся фрагментов за

**Рассчитанные и экспериментальные значения двугранных углов (град)
основной цепи грамицидина S**

Аминокислотный остаток	Расчет						Эксперимент			
	[292]		[294]		[296]		[299]		[300]	
	φ	ψ	φ	ψ	φ	ψ	φ	ψ	φ	ψ
<i>L</i> -Val ^{1,6}	-89	127	-82	137	-118	95	-120	120	-120	150
<i>L</i> -Om ^{2,7}	-143	128	-132	152	-73	107	-110	110	-125	132
<i>L</i> -Leu ^{3,8}	-198	110	-143	82	-102	124	-120	110	-130	100
<i>D</i> -Phe ^{4,9}	68	-140	58	-116	-33	-60	55	-110	65	-125
<i>L</i> -Pro ^{5,10}	-75	-16	-68	-31	-57	-60	-60	-40	-83	-12

вычетом энергии общих участков. Например, для тетрапептида X-Y-Z-T соответствующее выражение имеет вид: $U_{XYZT} = U_{XYZ} + U_{YZT} - U_{YZ}$. Процедура отбора конформаций более крупного фрагмента состоит в выделении конформации с минимальным значением энергии и исключении конформаций, энергия которых превышает определенную, наперед заданную величину. Сохранение для последующего расчета всех потенциально перспективных оптимальных структур фрагмента, а следовательно, и молекулы полностью зависит в данном подходе от выбранного значения единой для всего набора критической величины энергии. Расширение энергетического интервала отбора влечет за собой необходимость рассмотрения более значительного количества структурных вариантов. Это обстоятельство заставляет авторов [22, 48, 50] изыскивать всякого рода модификации расчетной методики, призванные сократить объем вычислительных работ. С целью уменьшения числа рассматриваемых конформаций при одновременном расширении критического интервала энергии С.Г. Галактионов и сотрудники предварительно рассчитывают модели, в которых все аминокислотные остатки, кроме Glu и Pro, заменены остатками аланина. Далее, для модельного пептида определяются все возможные оптимальные конформации, лучшие из которых затем служат исходными структурными вариантами основной цепи реального пептида. В основе этой процедуры лежит предположение о том, что «... иерархия стабильности различных структур олигопептидного фрагмента определяется, в основном, конформацией пептидного остова, от которой зависят общие пространственные очертания фрагмента и, следовательно, возможность реализации взаимодействий типа "остов – боковая цепь" и "боковая цепь – боковая цепь", роль которых сводится к стабилизации тех или иных пространственных структур, предопределенных конформацией остова» [22. С. 35–36]. Это основополагающее для всех работ группы Галактионова положение, с моей точки зрения, является ошибочным в принципе и как таковое служит причиной некоторых методологических погрешностей, ведущих к неправильным результатам и обобщениям.

Прежде чем рассмотреть предположение о доминирующей роли в структурной организации пептидов взаимодействий элементов основной цепи по существу, отметим иллюзорность самой надежды сделать на такой основе решение задачи более строгим и упростить расчет. При объективном подходе к анализу это предположение несколько не облегчает вычислительную процедуру, а даже, напротив, усложняет ее. Для каждого фрагмента приходится теперь сталкиваться с проблемой выбора критического интервала не один раз, а дважды – для аланиновой модели и реального пептида, причем в первом случае неопределенность в выборе никак не меньше, чем во втором. Для иллюстрации сказанного приведем цифры, полученные для тетрааланина. Полностью развернутая структура его основной цепи (B–B–B–B) проигрывает α -спиральной форме (R–R–R–R) около 8,0 ккал/моль. Исключение такой структуры будет неоправданным шагом, поскольку у реальных гетерогенных тетрапептидов при оптимальной укладке боковых цепей она практически изоэнергетична, а иногда даже предпочтительнее α -спирали. Если же включить в расчет развернутую форму основной цепи, т.е. выбрать для модельного пептида энергетический интервал отбора 0–8,0 ккал/моль, то через него пройдут практически все возможные конформационные состояния основной цепи тетрапептида с R- и B-формами остатков и многие состояния с L- и даже с H-формами. Говоря о принципиальной ошибочности обсуждаемого предположения, я имел в виду несостоятельность утверждения авторов [22] о доминирующем значении основной цепи в определении конформационных возможностей пептидов. Если бы это было так и составляющая пептидный остов в среднем одна треть всех атомов, действительно, детерминировала положения других двух третей атомов, принадлежащих боковым цепям, то все природные олигопептиды и белки должны были бы иметь или одинаковые формы основной цепи, или очень ограниченное их количество. Что же касается синтетических олиго- и полипептидов, построенных из остатков Gly и Ala, фактически лишенных боковых цепей, то их пространственное строение должно было бы описываться единичными жесткими структурами, а не состоянием статистического клубка, что имеет место в действительности. Предположение С.Г. Галактионова и соавт. [22] далеко от реальной картины. Вариации пространственных форм основной цепи у белков столь же множественны, как и вариации порядка расположения в этой цепи 20 стандартных аминокислотных остатков.

В табл. III.36 приведены энергетические характеристики двух тетрапептидов, содержащих одни и те же остатки и обладающих одинаковой по составу основной цепью. Тетрапептиды отличаются только порядком расположения аминокислот в цепи; в первом случае – это Phe-Trp-Leu-Ala, а во втором – Leu-Ala-Phe-Trp. Этого обстоятельства оказалось достаточно для существенного изменения конформационных возможностей тетрапептида. Из представленных в табл. III.36 результатов расчета ~ 1000 вариантов всех структурных типов каждого фрагмента видно, что у первого тетрапептида неоспоримым энергетическим преимуществом обладает α -спиральная оптимальная конформация. Лучший вариант второго структурного типа (*fe*) уступает ей 4,2 ккал/моль. Конформации с

**Энергетические характеристики (ккал/моль) глобальных конформаций
восьми шейпов пептидного скелета тетрапептидных фрагментов**

Шейп	Конформация	$U_{\text{общ}}$	Вид взаимодействия			Энергия взаимодействия		
			b_i-b_j	b_i-s_j	s_i-s_j	$U_{\text{вдв}}$	$U_{\text{эл}}$	$U_{\text{торс}}$
$C^\alpha\text{CO-Phe-Trp-Leu-Ala-NHC}^\alpha$								
<i>eee</i>	$B_{11}B_{13}B_{21}B$	8,0	-1,6	-7,1	-6,0	-42,3	7,3	0,2
<i>ee'</i>	$B_{21}B_{13}R_{32}B$	5,8	-0,7	-8,6	-5,8	-45,2	7,9	0,3
<i>eff</i>	$B_{31}R_{13}R_{21}R$	4,6	-5,8	-4,2	-5,7	-46,0	7,6	0,2
<i>fff</i>	$R_{11}R_{13}R_{21}R$	0	-9,6	-5,4	-6,1	-50,3	7,2	0,3
<i>ffe</i>	$R_{11}R_{11}B_{21}R$	5,9	-4,0	-6,3	-5,4	-44,8	7,7	0,2
<i>fee</i>	$R_{11}B_{33}B_{32}R$	9,9	-1,0	-6,2	-6,4	-40,3	7,1	0,3
<i>fef</i>	$R_{11}B_{22}R_{32}R$	4,2	-2,4	-6,6	-4,9	-47,1	7,7	0,8
<i>efe</i>	$B_{11}R_{13}B_{21}R$	4,6	-0,8	-8,9	-6,5	-46,6	7,7	0,7
$C^\alpha\text{-CO-Leu-Ala-Phe-Trp-NHC}^\alpha$								
<i>eee</i>	$B_{21}BB_{31}B_{33}$	1,8	-0,3	-11,2	-7,1	-47,3	7,6	0,4
<i>ee'</i>	$B_{21}BR_{11}R_{11}$	0,6	-2,9	-9,3	-7,6	-47,9	7,2	0,2
<i>eff</i>	$B_{31}RR_{11}R_{21}$	0	-6,9	-5,5	-7,9	-49,6	7,7	0,8
<i>fff</i>	$R_{32}RR_{31}R_{33}$	1,0	-5,4	-6,0	-7,7	-47,5	7,2	0,2
<i>ffe</i>	$R_{21}RB_{11}R_{32}$	4,5	-3,1	-9,6	-2,8	-44,4	7,6	0,2
<i>fee</i>	$R_{21}BB_{11}R_{32}$	6,4	-0,5	-10,7	-2,3	-42,7	7,7	0,3
<i>fef</i>	$R_{21}BR_{11}R_{11}$	0,9	-5,7	-7,7	-5,5	-47,8	7,3	0,3
<i>efe</i>	$B_{21}RB_{21}R_{33}$	4,1	-0,6	-11,5	-5,4	-46,1	7,8	1,3

формой основной цепи в виде α -спирали (R-R-R-R) предпочтительны и по энтропийному фактору: в интервал 0–4,2 ккал/моль, в котором отсутствуют структурные варианты всех других шейпов, попало более 30 конформационных состояний α -спиральной формы. У второго тетрапептида эти состояния теряют как энергетическое, так и энтропийное преимущество. Более выгодными оказываются конформации шейпов *eff*, *eff'* и *fef*. Даже β -структура с полностью развернутой формой основной цепи (шейп *eee*), уступающая α -спиральной структуре в первом фрагменте 8,0 ккал/моль, теперь проигрывает ей всего лишь 0,8 ккал/моль. Таким образом, не основная цепь пептида определяет его конформационные возможности, а аминокислотная последовательность, точнее, уникальное сочетание в ней боковых цепей.

Между взаимодействиями боковых цепей друг с другом и с элементами основной цепи, с одной стороны, и взаимодействиями последних между собой – с другой, в лучших конформациях пептида имеет место согласованность. Если говорить об иерархии, то скорее основная цепь, обладая огромной конформационной свободой и вдвое меньшим числом атомов, подстраивается под боковые цепи и принимает такую форму, которая обеспечивает максимально возможную сближенность валентно-несвязанных атомов и образование между ними эффективных стабилизирующих контактов. Важно понять, что по сравнению с детально изученной и

ставшей привычной ситуацией, обуславливающей пространственное строение обычных органических молекул, структурная организация пептидов, в том числе и низкомолекулярных, объясняется иными причинами. Если в первом случае из-за малого количества атомов и небольшого числа степеней свободы конформационные возможности молекулы определяются главным образом валентной схемой и стерическими ограничениями, то в пептидах и белках эти причины отступают на задний план. Здесь диктуют условия два обстоятельства – обилие конформационных степеней свободы и возможность образования уникальных структур, сцементированных огромным числом энергетически выгодных невалентных контактов.

Представление о пространственной структуре пептидов и белков, якобы "предопределенной конформацией остова", не следует ни из экспериментальных фактов, ни из результатов расчета. Оно родственно α -спиральной концепции и является следствием стереотипности мышления, а также, по-видимому, магии слов. Появление таких терминов, как "остов", "основа", "скелет", обычно связано с необходимостью подчеркнуть фундаментальные, самые существенные свойства структуры или ее частей. В лексикон исследователей пространственного строения пептидов и белков слова "пептидный остов" и "пептидный скелет" пришли от исследователей химического строения этих соединений. Там они совершенно точно передавали суть химической структуры изучаемых объектов. Но эти слова потеряли свой первозданный смысл и приобрели ложный, иллюзорный, как только стали употребляться в описаниях пространственного строения пептидов и белков. Основные цепи пептидных и белковых молекул обретают лишь видимость остова или скелета в нативных конформациях, т.е. в состоянии, когда реализована полная схема межостаточных невалентных взаимодействий, прежде всего, взаимодействий типа "боковая цепь – боковая цепь" и "боковая цепь – основная цепь". Вне этих взаимодействий, т.е. в условиях денатурации, видимость пропадает, иллюзия рассеивается и химическая основа пептидов и белков превращается в гибкую цепь, которая не может самостоятельно удерживать свою форму. В предположении об особой конформационной роли пептидного остова авторы [22] делают одно исключение. В связи с этим они замечают: "Сказанное не относится к ситуации, когда следует учитывать дающие весьма существенный вклад в конформационную энергию электростатические взаимодействия ионогенных групп: в этом случае конформация боковой цепи, несущей ионогенную группу, должна быть "приравнена" к конформации пептидного остова" [22. С. 36]. Таким образом, в структурной организации пептидов особая роль отводится также электростатическим взаимодействиям и, прежде всего, взаимодействиям между заряженными группами.

Г.И. Чипенс, из авторов работ [22, 48], в другом исследовании [199] идет в этом отношении еще дальше и провозглашает взаимодействия между противоположно заряженными ионными группировками главным стабилизирующим фактором. Более того, из всех взаимодействий такого вида Чипенс выделяет и отдает предпочтение полярному взаимодействию лишь между N- и C-концевыми частями последовательности, которое, по его мнению, делает свернутые квазициклические формы пептидов с

сближенными N- и C-кольцевыми остатками самыми выгодными по энергии. Он утверждает, что в формировании компактных квазициклических конформаций заключен открытый им "универсальный принцип" структурной организации и функционирования низкомолекулярных пептидных лигандов. Однако настораживает, прежде всего, универсальность провозглашенного "принципа", поскольку обязательное формирование у всех природных пептидов структуры со сближенными N- и C-концевыми остатками не следует из соображений общезначимого порядка и данных теоретического конформационного анализа. Расчет большого числа олигопептидов показал, что структуры подобного типа по вполне понятным причинам далеко не всегда являются самыми компактными и уж никогда не оказываются единственно возможными низкоэнергетическими состояниями. Сомнительным представляется и объяснение причины повышенной стабилизации квазициклических структур электростатическим взаимодействием противоположно заряженных N- и C-концов цепи. Во-первых, одно такое взаимодействие, особенно в полярной среде, не может быть отнесено к эффективному, тем более доминирующему фактору стабилизации. Во-вторых, энергия электростатических взаимодействий, обладающая наименьшей по сравнению с энергией других видов невалентных взаимодействий чувствительностью к изменению межатомного расстояния, может существенно сказаться на относительной величине общей энергии оптимальной конформации, но не на геометрических параметрах, абсолютной величине энергии и механизме формообразования конформации. В-третьих, остатки с целочисленными зарядами встречаются в любой части последовательности и оказывают влияние, как правило, конкурирующего характера на взаимодействие концевых ионогенных групп. И, наконец, многие природные олигопептиды не содержат полярных остатков на концах цепи.

Поэтому предложенный Чипенсом "принцип", по крайней мере, не может считаться универсальным. Но главное не в этом. Даже если бы он был справедливым, то и тогда его провозглашение не имело бы смысла из-за большой неопределенности самого понятия квазициклизации. Сказать, что свернутая квазициклическая форма олигопептида является характерной особенностью его структурной организации и ответственна за биологическую функцию – это почти ничего не сказать. Таких структур даже у небольших пептидов может быть много. Например, у тетрапептидной последовательности сближенность N- и C-полярных концевых остатков достигается в десятках различных форм основной цепи четырех шейпов.

Итак, характерными методологическими особенностями расчетов С.Г. Галактионова и соавт. [22, 48] пространственного строения пептидов являются предварительное рассмотрение конформационных возможностей аланиновых моделей, выделение априорно самых выгодных для основной цепи свернутых структур пептидного остова и поиск для них оптимальной взаимной ориентации боковых цепей исследуемого пептида. И в первой, и во второй стадии расчета акцент делается на электростатические взаимодействия ионогенных групп, считая их главным фактором структурной стабилизации. Они учитываются в монополюсном приближении с величиной диэлектрической проницаемости $\epsilon = 3,5$. При выборе столь малого значе-

ния ϵ , действительно приводящего к большому вкладу электростатики в общую конформационную энергию пептидной молекулы, авторы ссылаются на экспериментальные данные для плотной упаковки алкиламидов. Такой довод в пользу выбора малого значения ϵ нельзя признать достаточно веским, поскольку укладка пептидной цепи в нативную конформацию или (при наличии ряда изоэлектрических структур) установление конформационного равновесия происходит в водном растворе при физиологических условиях, препятствующих эффективному электростатическому взаимодействию, почти полностью сводя его на нет ($\epsilon = 81$). Сила теоретического конформационного анализа – в его принципиальной возможности моделировать действительный механизм укладки аминокислотной последовательности в нативное состояние. Электростатические взаимодействия, не являясь главным двигателем реальных механизмов структурной организации пептидов и белков, не должны играть такую роль в расчете.

Научный уровень отдельного исследования, как и целых областей естественнонаучных знаний, имеющих дело с множеством объектов или явлений, единичный анализ каждого из которых практически невозможен, определяется состоянием классификации изучаемых объектов или явлений, и не просто классификации, а естественной классификации, т.е. выполненной по совокупности самых существенных, внутренних признаков. К такому типу исследований, безусловно, принадлежит конформационный анализ пептидов и белков. Характерной особенностью всех рассматриваемых работ (см. табл. III.33) является отсутствие какой-либо классификации конформационных состояний молекул этого класса, не говоря уже о такой, которая была бы обоснована с физической точки зрения и охватывала бы все возможные структурные варианты, систематизированные в соответствии с субординационными взаимоотношениями по таксономическим категориям. Отсутствие структурной классификации может служить объективным признаком принадлежности изучаемых соединений к чисто случайным образованиям (статистическому клубку) или непонимания самых существенных свойств их пространственной организации. Поскольку первое исключено, то справедливо альтернативное предположение. В этом причина того, что выполненные расчеты не гарантированы ни от случайных пропусков, ни от неправильных оценок получаемых результатов. Без структурной классификации, четко сформулированных принципов общей теории и физической модели (также отсутствующих в обсуждаемых работах) невозможен объективный выбор конформационных состояний. Все оценки оптимальных конформаций в расчетах Галактионова, Шераги, Де-Козна и их сотрудников выполнены на основе относительных величин общей энергии, без количественного анализа вкладов от отдельных внутри- и межстаточных взаимодействий в структурных вариантах всевозможных форм различных типов.

На промежуточных стадиях расчета при рассмотрении конформационных возможностей сравнительно небольших фрагментов относительная величина общей энергии, как бы разумно велик ни был выбран критический интервал ее изменений, не в полной мере может служить надежным критерием отбора перспективных структурных вариантов. Рассчиты-

ваемые конформационные состояния фрагмента, принадлежащие различным формам и шейпам, неравноценны в этом отношении, и сопоставление величин их внутренней энергии без анализа соответствующих матриц межостаточных взаимодействий вряд ли является разумным. Оптимальные конформации каждой формы основной цепи и каждого шейпа можно разделить на три группы. В первую входят самые низкоэнергетические варианты, в которых при данной форме основной цепи в максимальной степени реализованы межостаточные стабилизирующие взаимодействия. Все они, безусловно, должны войти в последующий расчет фрагмента большей длины. В другую группу входят состояния с высокой энергией, которые неудовлетворительны вследствие дестабилизирующих взаимодействий, вызванных стерическими причинами. Если в пределах одной формы основной цепи наталкивания атомов не удается устранить, то такие структурные варианты исключаются из дальнейшего расчета. Кроме того, у каждого фрагмента имеется довольно большое число конформаций, находящихся в средней части энергетической шкалы. Они обладают сравнительно большой энергией не из-за напряженности, вызванной перекрытием ван-дер-ваальсовых радиусов атомов, а благодаря малому числу контактов, т.е. незначительности взаимодействий между остатками. Реализация таких конформаций маловероятна у свободной молекулы. Однако для рассчитываемого пептидного участка в более сложной последовательности они могут оказаться перспективными и должны учитываться в последующем анализе. Таким образом, оценку конформационных состояний фрагмента следует делать независимо для каждой его таксономической категории, во всех случаях учитывая характер межостаточных взаимодействий.

Можно сделать еще одно замечание, общее для выполненных расчетов конформаций олигопептидов. Оно касается выбора исходных состояний аминокислотных остатков в самом начале фрагментарного анализа. Этот вопрос имеет принципиальное значение, поскольку на всех стадиях расчета олигопептида фигурируют только выбранные вначале состояния остатков. Используемые наборы конформаций монопептидов, как правило, менее представительны, чем количества состояний аминокислотных остатков, встречающихся в белках известной структуры. Например, согласно рентгеноструктурным данным остатки Lys и Arg в белках могут принимать ~ 30 различных конформационных состояний. Естественно допустить, что и у низкомолекулярных пептидов их число будет не меньшим. Во многих же расчетах олигопептидов, включающих остатки Lys и Arg, учитываются не более девяти конформационных состояний: по три для основной цепи (R, B, L) и по три для боковой цепи ($\chi_1 \sim 60, 180, 60$; $\chi_2 = \chi_3 = \chi_4 = 180^\circ$). Тем самым боковые цепи остатков фактически принимаются вытянутыми конформационно жесткими стержнями. При таком подходе очевидно, нельзя рассчитывать на то, что найденные конформации олигопептида, действительно, представляют собой наиболее плотноупакованные структуры, обладающие минимальной энергией. Существенное сокращение объема вычислений за счет отказа от рассмотрения всех возможных состояний боковых цепей особенно подкупает авторов, по-видимому, тем, что оно не вступает в противоречие с их идейной позицией

в вопросе о приоритетном значении основной цепи в структурной организации пептидной молекулы.

Работы по конформационному анализу олигопептидов, перечисленные в табл. III.33, объединяет еще одна черта. Как результаты конкретных расчетов, так и использованные подходы ни в одном случае не прошли строгой экспериментальной проверки.

Принципы структурной организации олигопептидов. Выше были приведены мотивы, побудившие меня при формулировке общих выводов о характерных особенностях пространственного строения олигопептидов опираться лишь на расчетные данные собственных исследований (см. табл. III.31). В результате можно сформулировать следующие принципы структурной организации низкомолекулярных природных пептидов.

1. В физиологических условиях пространственное строение природного олигопептида описывается ограниченным набором низкоэнергетических компактных структур, стабильность которых обусловлена согласованностью всех внутри- и межстаточных невалентных взаимодействий.

2. Предпочтительные структуры олигопептида отличаются между собой шейпами пептидного скелета, в пределах одного шейпа – формами основной цепи и в пределах одной формы – ориентациями боковых цепей.

3. Смещение положения равновесия между предпочтительными структурами олигопептида осуществляется по определенному низкоэнергетическому механизму, включающему последовательные конформационные переходы.

4. Высокая чувствительность (легкая адаптируемость) положения конформационного равновесия природного олигопептида к окружающей среде (растворителю, рецептору, ферменту) и спонтанность конформационных переходов обусловлены строгой и альтернативной по своему характеру избирательностью низкоэнергетических конформаций к специфическим изменениям внешних условий.

Сформулированные принципы структурной организации природных олигопептидов являются необходимой основой для решения задачи структурно-функциональной организации этих соединений, обсуждаемой в следующем томе. Сейчас же важно отметить, что установление таких принципов подвело наше рассмотрение непосредственно к самому ответственному моменту исследования одной из фундаментальных задач проблемы белка – завершающему этапу изучения структурной организации белковых молекул и к решению вопроса о возможности априорного расчета их нативных трехмерных структур на основе известной аминокислотной последовательности, предложенной автором теории и разработанного им метода расчета. Перед обсуждением результатов конформационного анализа белков и количественной оценки функций дальних взаимодействий еще раз напомним о роли ближних и средних взаимодействий в структурной организации олигомерной аминокислотной последовательности.

При сравнении конформационных возможностей природных олигопептидов и белков следует иметь в виду некоторую условность такого разделения. Встречающиеся в природе последовательности содержат от нескольких единиц до многих сотен аминокислотных остатков. По мере

№ п/п	Природные олиго- и полипептиды	Число аминокислотных остатков в последовательности											Литературный источник
		5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	
1	БПП ₅	ооооо											[1, 245-248]
2	БПП ₉	ооооооооо											[4]
3	БПП ₁₀	оооооооооо											[5, 6, 249]
4	Тимопептин	ооооо											[251]
5	β-Казоморфин	ооооо											[250]
6	Ангитензин II	ооооооооо											[32, 252]
7	Окситоцин	ооооооооо											[106]
8	Вазопрессин	ооооооооо											[107]
9	Мезоцотин	ооооооооо											[108]
10	Вазотоцин	ооооооооо											[107]
11	Пептид δ-сна	ооооооооо											[160, 258]
12	Leu-энкефалин	ооооо											[157]
13	α-Меланотропин	ооооооооооо											[163]
14	β-Меланотропин быка	ооооооооооооо											[31]
15	β-Меланотропин человека	оооооооооооооо											[256]
16	α-Эндорфин	ооооооооооооо											[158]
17	δ-Эндорфин	ооооооооооооооо											[158]
18	β-Эндорфин	оооооооооооооооо											[159]
19	Met-энкефалин	ооооо											[157]
20	Секретин	ооооооооооооооо											[215, 260-262]
21	Аламин	ооооооооооооооо											[85-89]
22	Тертиалин	ооооооооооооооо											[100]
23	MCD-пептид	ооооооооооооооо											[101]
24	Инсектоксин I ₁	оооооооооооооооо											[103]
25	Фрагмент соматотропина человека	оооооооооооооооо											[259]
26	α-Неоэндофин	ооооооооооо											[161]
27	β-Неоэндофин	ооооооооооо											[161]
28	Адренорфин	ооооооооооо											[164]
29	ОП ₉	ооооооооооо											[162]
30	Фрагмент нейротоксина II	оооооооооооооооо											[263]
31	БППИ	оооооооооооооооо											[264]

Р и с. III.32. Чередование в природных олигопептидах конформационно жестких (темные клетки) и конформационно лабильных участков цепи БПП₅, БПП₉, БПП₁₀ – пента- и декапептиды брадикининагенирующего действия. ОП₉ – октапептид опиоидного действия. БППИ – бычий панкреатический трипсиновый ингибитор

перехода от низкомолекулярных пептидов к высокомолекулярным белкам конформационные свойства, по-видимому, изменяются не скачкообразно, а постепенно. Нет сомнения, что ближние и средние взаимодействия, локализованные на небольших участках последовательности, играют одинаковую роль в формообразовании и олиго-, и полипептидов. В главах 4–7 было показано, что роль ближних взаимодействий заключается в формировании из свободных стандартных аминокислотных остатков наборов изоэнергетических предпочтительных конформационных состояний, которые только и могут быть реализованы у олиго- и полипептидов (см. табл. II.17). Поскольку нативные белки имеют строго детерминированные структуры, где остатки принимают вполне определенные конформации (из набора состояний, дозволенных по ближним взаимодействиям), то из соображений общего порядка очевидно, что роль средних взаимодействий должна сводиться к ограничению конформационной свободы остатков, а роль дальних взаимодействий – к последующему лишению их этой свободы.

Конформационный анализ десятков природных олигопептидов, включающих также 20, 30 и более аминокислотных остатков (см. табл. III.31), позволил не только пояснить для каждого соединения проявление средних взаимодействий и произвести соответствующие количественные оценки, но и выявить общую для их структурной организации особенность. Расчет показал, что у олигопептидов, даже сравнительно коротких, за счет средних взаимодействий может происходить структурная детерминация, т.е. образовываться локальные микронуклеации. Конформационно жесткие участки последовательности, чередующиеся с конформационно лабильными участками, были найдены у всех исследованных автором и сотр. природных пептидов, что наглядно иллюстрирует рис. III.32. Обнаруженная конформационная гетерогенность цепи представляет первостепенный интерес для понимания структурной организации белков и расчета их конформаций. Ее существование было постулировано мною в бифуркационной теории (см. гл. 2) как необходимое условие самопроизвольной, быстрой и безошибочной сборки белковых цепей по статистико-детерминистическому механизму. Результаты конформационного анализа большого числа олигопептидов различной длины независимо подтвердили это положение теории. Таким образом, роль средних взаимодействий заключается в реализации природной аминокислотной последовательности с конформационной гетерогенностью, проявляющейся в образовании альтернирующих конформационно жестких и лабильных участков цепи.

В белковых последовательностях естественно ожидать существования участков, которые, как и в случае сложных олигопептидов, складываются почти однозначным образом только за счет ближних и средних взаимодействий. Тогда дальние взаимодействия для таких структурно-автономных, нуклеационных белковых участков будут являться в основном следствием уже сложившихся пространственных форм, а не причиной их образования. Из общих соображений можно полагать, что не все олигопептидные участки белка должны обладать такими взаимодействиями. Для создания компактной глобулы требуется чередование конформационно жестких по ближним и средним взаимодействиям нуклеаций с более

лабильными в отношении этих взаимодействий фрагментами Конформационные состояния последних окончательно детерминируются за счет дальних взаимодействий, возникающих при ассоциации нуклеаций Следовательно, можно считать, что различие в структурной организации олигопептидов и белков касается только дальних взаимодействий, значение которых возрастает с удлинением аминокислотной последовательности

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Ondetti M A , Pluscec J , Weaver E R et al // Chemistry and biology of peptide Proc of the 3rd Amer peptide symp Boston Ann Arbor Science, 1972 P 525-532
- 2 Chusman D W , Pluscec J , Williams N J et al // Experientia 1973 Vol 29 P 1032-1036
- 3 Севастьянова Н Н Попов Е М // Биооргани химия 1978 Т 4 С 997-1016
- 4 Архипова С Ф , Севастьянова Н Н , Липкинд Г М , Попов Е М // Там же 1977 Т 3 С 335-347
- 5 Севастьянова Н Н Липкинд Г М Архипова С Ф , Попов Е М // Там же С 473-484
- 6 Севастьянова Н Н Попов Е М // Там же 1980 Т 6 С 547-562
- 7 Arakawa K , Bumpus F M // J Amer Chem Soc 1961 Vol 83 P 728-732
- 8 Ferreira A T , Hampe O G , Paiva A C M // Biochemistry 1969 Vol 8 P 3483-3487
- 9 Juliano L , Paiva A C M // Ibid 1974 Vol 13 P 2445-2450
- 10 Glickson J D , Cunningham W D , Marshall G R // Ibid 1973 Vol 12 P 3684-3692
- 11 Smeby R R , Arakawa K , Bumpus F M , Maisch M M // Biochim et biophys acta 1962 Vol 58 P 550-557
- 12 Feimandjian S , Fromageot P I , Tishechenko A M et al // Europ J Biochem 1972 Vol 28 P 174-182
- 13 Matsoukas J M , Moore G J // Spectrosc Lett 1988 Vol 21 P 477-491
- 14 Matsoukas J M , Moore G J // Arch Biochem and Biophys 1986 Vol 248 P 419-423
- 15 Paiva T B , Paiva A C , Scheraga H A // Biochemistry 1963 Vol 2 P 1327-1334
- 16 Weinkam R J , Jorgensen E C // J Amer Chem Soc 1971 Vol 93 P 7033-7038
- 17 Printz M P , Nemethy G , Bleich H // Nature New Biol 1972 Vol 237 P 135
- 18 Devynck M -A , Pernollet M -G , Meyer P et al // Ibid 1973 Vol 245 P 55-58
- 19 Fermanjian S , Lintner K , Haar W et al / Peptides, 1976 / Ed A Loffet Brussel Univ of Brussel, 1976 P 514-525
- 20 Matsoukas J M , Bigam G , Zhou N , Moore G J // Peptides 1990 Vol 11 P 359-366
- 21 Nikiforovich G V , Vesterman B C , Betts J // Biophys Chem 1988 Vol 31 P 101-106
- 22 Галактионов С Г Никифорович Г В Чипенс Г И Шендерович М Д // Ангиотензин Молекулярные механизмы действия Рига Зинатне, 1979
- 23 Regoli D , Park W K , Rioux F // Pharmacol Rev 1974 Vol 26 P 69-123
- 24 Printz M P , Williams H P , Craig L C // Proc Nat Acad Sci US 1972 Vol 69 P 378-382
- 25 Nabedryck-Viala E , Thierry C , Calvest P , Fermanjian S // FEBS Lett 1975 Vol 58 P 273-276
- 26 Duncia J V , Chiu A T , Carini D J et al // J Med Chem 1990 Vol 33 P 1312-1329
- 27 Nikiforovich G V , Rao J L F , Plucinska K et al // Biochemistry 1994 Vol 33 P 3591-3598
- 28 Попов Е М // Молекуляр биология 1985 Т 19 С 1107-1138
- 29 Попов Е М // Успехи химии 1994 Т 63 С 1004-1026
- 30 Попов Е М // Intern J Quant Chem 1979 Vol 16 P 707-737
- 31 Akhmedov N A , Akhverdieva G A , Popov E M // Intern J Peptide and Protein Res 1986 Vol 27 P 95-111
- 32 Гогитидзе Т В Попов Е М // Биооргани химия 1993 Т 19 С 517-535
- 33 Craig I C , Harfenist E J , Palladini A C // Biochemistry 1964 Vol 3, N 6 P 764-769
- 34 Franze de Fernandez M T , Delius A E , Palladini A C // Biochim et biophys acta 1968 Vol 154, N 1 P 223-225
- 35 Lenkinski R E , Stephens R E , Krishna N R // Ibid 1981 Vol 667, N 1 P 157-167
- 36 Bleich H E , Galaray R E , Printz M P // J Amer Chem Soc 1973 Vol 95 N 6 P 2041-2042

32. Marshall G R // Biochemistry 1973 Vol 12 N 1 P 19-25
33. Lintner K Feimanian S Fromageout P et al // FEBS Lett 1975 Vol 56, N 2 P 366-369
34. Feimanian S Moigat J L, Fromageout P // Europ J Biochem 1971 Vol 24, N 2 P 252-258
40. Graft D Feimanian S, Fromageout P et al // Ibid 1976 Vol 61, N 1 P 297-305
41. Секацис И П Анцанс Ю А Бисениеце Д А Чипенс Г И // Изв АН СССР Сер хим 1988 № 4 С 478-486
42. Bumpus F M // Fed Proc 1977 Vol 36, N 8 P 2128-2132
43. Секацис И П Лиениньш Э Э Анцанс Ю А и др // Биоорган химия 1981 Т 7, № 7 С 971-979
44. Deslaughters R Paiva A C M Schaumburg K Smith J C P // Biochemistry 1975 Vol 14, N 5 P 878-886
45. Glickson J D Dadok J Marshall G R // Ibid 1974 Vol 13, N 1 P 11-14
46. Marshall G R, Bosshard W H Glickson J D // Nature New Biol 1973 Vol 245, N 1 P. 125-127
47. De-Coen J L Roulston E // Biopolymers 1977 Vol 16, N 8 P 1929-1943
48. Никифорович Г В Галактионов С Г Чипенс Г И Конформации пептидных биорегуляторов М Медицина, 1983
49. Marchionni C Maigret B Premilat S // Biochem and Biophys Res Commun 1983 Vol 112, N 1 P 339-346
50. Nikiforovich G V, Vesterman B, Betins J Podins L // J Biomol Struct Dyn 1987 Vol 4 N 6 P 1119-1135
51. Попов Е М Структурная организация белка М Наука, 1992
52. Smith G D Criffin J F // Science 1978 Vol 199 P 1214-1216
53. Blundell T L Hearn L Tickle I J et al // Ibid 1979 Vol 205 P 220
54. Camerman A Mastropaolo D Karle I L et al // Nature 1983 Vol 303 P 447-450
55. Karle I L, Karle J Mastropaolo D et al // Acta crystallogr B 1983 Vol 39 P 625-637
56. Mastropaolo D Camerman A Camerman N // Biochem and Biophys Res Commun 1986 Vol 134 P 698-703
57. Criffin J F, Lings D A, Smith G D et al // Proc Nat Acad Sci US 1986 Vol 83 P. 3272-3276
58. Wood S P, Tickle I J, Treharne A M et al // Science 1986 Vol 232 P 663-668
59. Hrygu V J // TIPS 1987 Vol 8 P 336-339
60. Тищенко Г Н // Кристаллохимия 1979 Т 13 С 189-249
61. Geddes A I, Akrigg D // Acta crystallogr B 1976 Vol 32, N 24 P 3164-3174
62. Попов Е М, Плетнев В З // Биофизика 1971 Т 16 С 407-414
63. Плетнев В З Галицкий Н М // Биоорган химия 1977 Т 3 С 1611-1622
64. Попов Е М, Плетнев В З Евстратов А В и др // Химия природ соединений 1970 № 5 С 616-622
65. Плетнев В З, Попов Е М // Изв АН СССР Сер хим 1970 № 6 С 991-995
66. Tischenko G N, Karimov Z Vainstein V K et al // FEBS Lett 1976 Vol 65, N 5 P 615-619
67. Johnson L F Schwartz I L, Walter R // Proc Nat Acad Soc US 1969 Vol 64, N 5 P 1269-1275
68. Honig B Kabat E A, Katz L et al // J Mol Biol 1973 Vol 80 P 277-295
69. Kabat E A Wu T T // Proc Nat Acad Sci US 1973 Vol 75 P 13-31
70. Katelchuck D, Scheraga H A, Walter R // Ibid 1972 Vol 69 P 3629-3633
71. Овчинников Ю А Иванов В Т Шкроб А М Мембраноактивные комплексоны М Наука, 1976
72. Bystrov V F Okhanov V B Miroshnikov A I Ovchinnikov Yu A // FEBS Lett 1980 Vol 119, N 1 P 113-117
73. Anfinsen C B // Science 1973 Vol 181 P 223-230
74. Habermann E, Reiz K G // Biochem J 1965 Vol 343 P 192-203
75. Habermann E // Science 1972 Vol 177 P 314-322
76. Shipolini R Bradbury A F, Callewaert G L Vernon C A // Chem Commun 1967 Vol 14 P 679-680
77. Vincent J P Schweitz H Lazdunski M // Biochemistry 1975 Vol 11 P 2521-2525
78. Granier C Muller P, Rietschoten J // Europ J Biochem 1978 Vol 82 P 293-299

- 79 *Miroshnikov A I Elyakova E G Kudelin A B Senyavina L B* // Sov J Bioorg Chem (Engl Transl.) 1978 Vol 4 P 746-752
- 80 *Hider R C Ragnarsson U* // FEBS Lett 1980 Vol 119 P 189-193
- 81 *Wemmer D Kallenbach N R* // Biochemistry 1983 Vol 22 P 1901-1906
- 82 *Pease J H Wemmer D E* // Ibid 1988 Vol 27 P 8491-8498
- 83 *Chau M H Nelson J W* // Ibid 1992 Vol 31 P 4445-4450
- 84 *Van Reitschoten J Granier C Rochat H et al* // Europ J Biochem 1975 Vol 56 P 36-40
- 85 *Попов Е М Мельников П Н* // Биооргани химия 1979 Т 5 С 828-847
- 86 *Мельников П Н Попов Е М* // Там же С 1011-1924
- 87 *Попов Е М Мельников П Н* // Там же С 1471-1493
- 88 *Мельников П Н Попов Е М* // Там же 1980 Т 6 С 21-30
- 89 *Мельников П Н Попов Е М* // Молекуляр химия 1979 Т 13 С 935-946
- 90 *Freeman C M Callow C R A Hemmings A M Hider R C* // FEBS Lett 1986 Vol 197 P 289-296
- 91 *Hider R C Ragnarsson U* // Biochim et biophys acta 1981 Vol 667 P 197-208
- 92 *Оханов В В Афанасьев В А Гуревич А С и др* // Биооргани химия 1980 Т 6 С 840-864
- 93 *Ianin I Wodak S Levitt M Margret B* // J Mol Biol 1978 Vol 125 P 357-386
- 94 *Chou P Y Fasman G D* // Adv Enzymol 1978 Vol 47 P 47-148
- 95 *Levitt M* // Biochemistry 1978 Vol 17 P 4277-4285
- 96 *Greenfield N Fasman G D* // Ibid 1969 Vol 8 P 4108-4116
- 97 *Brahmachari S K Ananthanarayanan V S Brahm S I et al* // Biochem and Biophys Res Commun 1979 Vol 86 P 605-612
- 98 *Попов Е М Демин В В Шибанова Е Д* // Проблема белка Т 2 Пространственное строение белка / М Наука 1996
- 99 *Vystrov V F* // Progr NMR Spectrosc 1976 Vol 10 P 41-81
- 100 *Ломизе А Л Попов Е М* // Биооргани химия 1982 Т 8 С 1474-1485
- 101 *Ломизе А Л Попов Е М* // Молекуляр биология 1983 Т 17 С 1212-1220
- 102 *Гришин Е В Солдатов Н М Таишухамедов Б А и др* // Биооргани химия 1978 Т 4 С 450-460
- 103 *Попов Е М Швырков В Н Снасов В З* // Там же 1982 Т 8 С 61-71
- 104 *Scott R A Scheraga H A* // J Chem Phys 1966 Vol 56 P 2091-2101
- 105 *Липкинд Г М Архипова С Ф Попов Г М* // Журн структур химии 1970 Т 11 С 121-126
- 106 *Снасов В З Попов Е М* // Биооргани химия 1981 Т 7 С 25-44
- 107 *Снасов В З Попов Е М* // Там же С 502-514
- 108 *Motanu F A McGuire R F Burgess A W Scheraga H A* // J Phys Chem 1975 Vol 79 P 2361-2383
- 109 *Bystrov V F Ivanov V T Poinova S L et al* // Tetrahedron 1973 Vol 29 N 4 P 873-878
- 110 *Glackson J D Rowan R Pitner T P et al* // Biochemistry 1976 Vol 15 N 6 P 1111-1119
- 111 *Merladi J P Hruby V J Brewster A I R* // Proc Nat Acad Sci US 1977 Vol 74 N 7 P 1373-1377
- 112 *Maxfield F R Scheraga H A* // Biochemistry 1977 Vol 16 N 24 P 4443-4449
- 113 *Tu A T Bjarnson T B Hruby T V* // Biochim et biophys acta 1978 Vol 533 P 530-533
- 114 *Nikiforovich G V Lionova V I Galactionov S G Chipens G I* // Intern J Peptide and Protein Res 1979 Vol 13 N 2 P 363-373
- 115 *Pert C B Snyder S H* // Science 1973 Vol 179 P 1011-1033
- 116 *Simon F I Hiller J M Edelman I* // Proc Nat Acad Sci US 1973 Vol 70 P 1947-1949
- 117 *Terenius L* // Acta pharmacol et toxicol 1973 Vol 32 P 317-321
- 118 *Terenius L Wahlstrom A* // Ibid 1974 Vol 35 P 55-57
- 119 *Terenius L Wahlstrom A* // Acta physiol scand 1975 Vol 94 P 74-78
- 120 *Hudges I Smith G W Kosterlitz H W et al* // Nature 1975 Vol 258 P 577-579
- 121 *Simantov H Snyder S H* // Mol Pharmacol 1976 Vol 12 P 967-988
- 122 *Li C H* // Nature 1964 Vol 201 P 924-925
- 123 *Li C H Chung D* // Proc Nat Acad Sci US 1976 Vol 73 P 1145-1148
- 124 *Cox B M Goldstein A Li C H* // Ibid P 1821-1823
- 125 *Goldstein A* // Science 1976 Vol 193 P 1081-1086
- 126 *Graf L Ronai A Z Bajusz S et al* // FEBS Lett 1976 Vol 64 P 181-185

- 127 *Teschemacher H Ophelm K E Cox B Goldstein A // Life Sci 1976 Vol 16 P 1771-1775*
- 128 *Guillemin R Ling N Burgs R // Proc Nat Acad Sci US 1976 Vol 73 P 782-785*
- 129 *Ling N Guillemin R // Ibid P 3308-3310*
- 130 *Ling N Burgur R Guillemin R // Ibid P 3942-3946*
- 131 *Ling N // Biochem and Biophys Res Commun 1977 Vol 74 P 248-255*
- 132 *Szekely J L Ronai A Zausa D K et al // Experientia 1977 Vol 33 P 54-55*
- 133 *Graf L // Receptors Proc VII Intern Congr Pharmacol Paris 1978 Oxford, 1979 P 3-14*
- 134 *Goldstein A Tachibana S Lowney L I et al // Proc Nat Acad Sci US 1979 Vol 76 P 6666-6670*
- 135 *Kangawa K Mutsuo H Igarashi M / Biochem and Biophys Res Commun 1979 Vol 86 P 153-160*
- 136 *Kangawa K Minamino N Chino N et al // Ibid 1981 Vol 99 P 871-876*
- 137 *Minamino N Kangawa K Chino N et al // Ibid P 864-870*
- 138 *Nakanishi S Inoue A Kita T et al // Nature 1979 Vol 278 P 423-427*
- 139 *Эндорфины / Под ред Э Коста М Трабукки М Мнр 1981*
- 140 *Скрябин К Г // ЖБХО 1984 Т 29 С 195-204*
- 141 *Mayer D J Price D D Rafi A // Brain Res 1977 Vol 21 P 368-372*
- 142 *Bloom F Segal D Ling N Guillemin R // Science 1976 Vol 194 P 630-632*
- 143 *Jacquet Y F Marks N // Ibid P 632-635*
- 144 *Kastin A J Scollan E L King M G et al // Pharmacol Biochem and Behav 1976 Vol 5 P 691-693*
- 145 *Li C H // Adv Biochem and Psychopharmacol 1979 Vol 20 P 145-153*
- 146 *Li C H Chung D Yamashiro D Lee C Y // Proc Nat Acad Sci US 1978 Vol 75 P 4306-4309*
- 147 *Li C H Tseng L Ferrara O Yamashiro D // Ibid 1980 Vol 77 P 2303-2304*
- 148 *Смагин В Г Виноградов В А Булгаков С А Лиганды опиатных рецепторов Гастроэнтерологические аспекты М Наука 1983*
- 149 *Jones C R Gibbons W A Garsky V // Nature 1976 Vol 262 P 779-782*
- 150 *Yang J T Berley T A Chen C C Li C H // Proc Nat Acad Sci US 1974 Vol 74 P 3235-3238*
- 151 *Spirtes M A Schwartz R W Mattice W L Coy D H // Biochem and Biophys Res Commun 1978 Vol 81 P 602-609*
- 152 *Berley T A Li C H // Biochemistry 1983 Vol 22 P 2671-2675*
- 153 *Rogues B P Garbay Jaurequiberry C Oberlin R et al // Nature 1976 Vol 262 P 778-779*
- 154 *Ferrara P Li C H // J Peptide and Protein Res 1980 Vol 16 P 66-59*
- 155 *Deskin J F W Dostrovsky J A Smuth D C // Biochem J 1980 Vol 189 P 501-506*
- 156 *Ацмариин И П // Журн эволюц биохимии и физиологии 1977 Т 13 С 570-578*
- 157 *Попов Е М Годжаев Н М Ахмедов Н А Сулейманова Е В // Биоорган химия 1990 Т 16 С 482-491*
- 158 *Сулейманова Е В Годжаев Н М Ахмедов Н А Попов Е М // Там же С 649-660*
- 159 *Ахмедов Н А Годжаев Н М Сулейманова Е В Попов Е М // Там же С 661-667*
- 160 *Ахмедов Н А Аббаслы Р М Попов Е М // Молекуляр биология 1989 Т 23 С 676-682*
- 161 *Ахмедов Н А Ахмедов Н Ф Аббаслы Р М Попов Е М // Биоорган химия 1992 Т 18 С 1464-1472*
- 162 *Попов Е М Ахмедов Н А Махмудова Т А // Там же С 1454-1463*
- 163 *Ахмедов Н А Попов Е М // Молекуляр биология 1989 Т 23 С 249-254*
- 164 *Ахмедов Н А Махмудова Т А Попов Е М // Биоорган химия 1993 Т 19 С 623-628*
- 165 *Garbay Jaurequiberry C Rogues B P Oberlin R et al // Biochem and Biophys Res Commun 1976 Vol 71 P 558-565*
- 166 *Bradbury A F Smith D C Snell C R // Nature 1976 Vol 262 P 779-782*
- 167 *Humblot C De Coen J L // Intern J Biol Macromol 1981 Vol 3 P 37-45*
- 168 *Khaled M A Long M M Thompson W D et al // Biochem and Biophys Res Commun 1977 Vol 76 P 224-231*
- 169 *Bleich H E Day A R Freer R J Claset J A // Ibid Vol 74 P 592-598*
- 170 *Bleich H E Cutnell J D Day A R et al // Proc Nat Acad Sci US 1976 Vol 73 P 2589-2593*

- 171 Deslauriers R Tancrede P McGregor WH et al // Nucl magn resonance spectroscopy mol biol Proc XI Jerusalem symp Jerusalem 1978 P 285-295
- 172 Bleich HE Day AR Freer RJ Clusell JA // Biochem and Biophys Res Commun 1979 Vol 87 N 6 P 1146-1153
- 173 Nigashijima I Kobayashi J Nagai U Miyazawa T // Europ J Biochem 1979 Vol 97 N 1 P 43-57
- 174 Levin BA Rabenstein DL Smyth S Williams RJP // Biochim et biophys acta 1979 Vol 579 P 279-290
- 175 Picone D D Ursi A Motta A et al // Europ J Biochem 1990 Vol 192 P 433-439
- 176 Griffin JF Langs DA Smith GD et al // Proc Nat Acad Sci US 1986 Vol 83 P 3272-3276
- 177 Schuller PW // The peptide / Ed E Gross J Meinhofer NY Acad press, 1984 Vol 6 P 219-268
- 178 Doi M Tanaka M Ishida M et al // J Biochem (Tokyo) 1987 Vol 101 P 485-490
- 179 Aubry A Birlirakis N Sakarellos Datsiotis M et al // Biopolymers 1989 Vol 28 P 27-40
- 180 De Coen JL Humblet C Koch MN // FEBS Lett 1977 Vol 73 P 38-42
- 181 Isogai Y Nemethy G Scheraga HA // Proc Nat Acad Sci US 1977 Vol 74 P 414-418
- 182 Momany FE // Biochem and Biophys Res Commun 1977 Vol 75 P 1098-1103
- 183 Terenius L Wahlstrom A Lindeberg G et al // Ibid 1976 Vol 71 P 175-179
- 184 Pert CB Pert A Chang JK Fong BIW // Science 1976 Vol 194 P 330-332
- 185 Coy DH Kastin AJ Schally AV et al // Biochem and Biophys Res Commun 1976 Vol 73 P 632-638
- 186 Balodis Yu Yu Nikiforovich GV Grinstein IV et al // FEBS Lett 1978 Vol 86 P 239-242
- 187 Yoneda Sh Kitamura K Doi M et al // Ibid 1988 Vol 239 P 271-275
- 188 Li Z Scheraga HA // Proc Nat Acad Sci US 1987 Vol 84 P 6611-6615
- 189 Ripoll D Scheraga HA // Biopolymers 1988 Vol 27 P 1283-1303
- 190 Ripoll D Scheraga HA // J Protein Chem 1989 Vol 2 P 263-287
- 191 Karplus M McCommon JA // Annu Rev Biochem 1983 Vol 52 P 263-290
- 192 Go N Noguti T Nishikawa T // Proc Nat Acad Sci US 1983 Vol 80 P 3693-3698
- 193 Noguti T Go N // Biopolymers 1985 Vol 24 P 527-536
- 194 Scheraga HA / Biological and artificial intelligence systems / Ed E Clementy, S Chin Leiden, 1988 P 1-14
- 195 Mackay DHJ Cross AJ Hadler AT // Prediction of protein structure and the principles of protein conformation / Ed GD Fasman NY Plenum press, 1989 P 317-327
- 196 Freyberg B Braun W // J Comput Chem 1991 Vol 12 P 1065-1076
- 197 Abagyan R Argos P // J Mol Biol 1992 Vol 225 P 519-527
- 198 Алешин Б В Гистофизиология гипоталамо гипофизарной системы М Медицина, 1971
- 199 Чипенс Г И Полевая Л К Веретенникова Н Н Крикус А Ю Структура и функции низкомолекулярных пептидов Рига Зинатне, 1980
- 200 Kastin AJ Banks WA Zadina JB Graf M // Life Sci 1983 Vol 32 P 295-301
- 201 Sedan HG Chretien M // Proc Nat Acad Sci US 1981 Vol 78 P 4236-4240
- 202 Hammond GL Chung D Li CH // Biochem and Biophys Res Commun 1982 Vol 108 P 118-123
- 203 Ling N Ying S Minich S Guillemun R // Life Sci 1979 Vol 25 P 1773-1780
- 204 Pedersen RC Brownie AC // Proc Nat Acad Sci US 1980 Vol 77 P 2239-2243
- 205 Oki S Nakao K Nakai Y et al // Europ J Pharmacol 1980 Vol 64 P 161-164
- 206 Van Ree JM Bohus B Csontos KM et al // Life Sci 1981 Vol 28 P 2875-2888
- 207 Greff D Toma F Fermanjian S et al // Biochim et biophys acta 1976 Vol 439 P 219-231
- 208 Nabedryk Viola E Thierry C Cabvet P et al // Ibid 1978 Vol 536 P 252-262
- 209 Toma F Fermanjian S Kisfaludy ML // Biopolymers 1981 Vol 20 P 901-913
- 210 Toma F Dive V Lat Thanh H et al // Biochimie 1981 Vol 63 P 907-910
- 211 Hrubly VJ Mosberg HJ Sawyer TK et al // Biopolymers 1983 Vol 22 P 517-530
- 212 Липенкаула И К Скуиньи А А Романовский П Я и др // Биооргани химия 1985 Т 11 С 1157-1166
- 213 Юдаев Н А Утетева З Ф // Биохимия гормонов в гормональной регуляции М Наука 1976 С 10-44

- 214 Nikiforovich G V Shenderovich M D Chipens G I // FEBS Lett 1981 Vol 126 P 180-182
- 215 Агаева Г А Ахмедов Н А Попов Е М // Молекуляр биология 1985 Т 19 С 1107-1138
- 216 Bayliss V M Starling E H // Physiology 1902 Vol 28 P 325-352
- 217 Jorpes J E // Gastroenterology 1968 Vol 55 P 157-164
- 218 Bodanszky M Ondetti M A Levine S D et al // Chem Industr 1966 Vol 42 P 1757-1758
- 219 Розен В Б Основы эндокринологии М Высш шк , 1980
- 220 Szczecowka J Lin P E Efendic S // Endocrinology 1982 Vol 110 P 1268-1272
- 221 Lebovitz H E Feinglos M N // Metabolism 1980 Vol 29 P 474-481
- 222 Климов П К Пептиды и пищеварительная система Л Наука 1983
- 223 Mutt V Carlquist M Tatemoto K // Life Sci 1979 Vol 25 P 1703-1708
- 224 Andersson C Fuxe K Mutt V et al // Acta endocrinol 1979 Vol 91 suppl P 243-248
- 225 Samson W K Limpkin M D Vijayan E McCann S M // Endocrinol Exp 1982 Vol 16 P 177-189
- 226 Charlton C G // Diss Abstr Intern 1985 Vol 45 P 2877-2878
- 227 Ip Mancy Y Baldwin C Zigmund R R // Peptides 1984 Vol 5 P 309-315
- 228 Samson W K Limpkin M D McCann S M // Life Sci 1984 Vol 34 P 155-164
- 229 Robberecht P Conlon T Gardner J D // J Biol Chem 1976 Vol 251 P 4635-4639
- 230 König W Bickel M Karch K et al // Peptides 1984 Vol 5 P 189-193
- 231 Bodanszky M Ondetti M A Levine S D Williams N J // J Amer Chem Soc 1967 Vol 89 P 6753-6757
- 232 Bodanszky A Ondetti M A Mutt V Bodanszky M // Ibid 1969 Vol 91 P 944-949
- 233 Fink M L Bodanszky M // J Amer Chem Soc 1976 Vol 98 P 974-977
- 234 Bodanszky M Fink M L // Bioorg Chem 1976 Vol 5 P 275-282
- 235 Bodanszky M Fink M L Boden G // Gastroenterology 1977 Vol 72 P 801-802
- 236 Patel D J Bodanszky M Ondetti M A // Micromolecules 1970 Vol 3 P 694-698
- 237 Jaeger E Knof S Scharf R et al // Scand J Gastroenterol 1978 Vol 13 suppl P 93-97
- 238 Bodanszky M Hansmann E // Intern J Peptide and Protein Res 1983 Vol 21 P 216-218
- 239 Robinson R M Blakeney E W Mattice W L // Biopolymers 1982 Vol 21 P 1217-1228
- 240 Clore G M Martin S R Gronenborn A M // J Mol Biol 1986 Vol 191 P 553-561
- 241 Braun W Wider G Lee K H Wuthrich K // Ibid 1983 Vol 169 P 921-948
- 242 Gronenborn A M Bovermann G Clore G M // FEBS Lett 1987 Vol 215 P 88-94
- 243 Clore G M Nilges M Brunger A T Gronenborn A M // Europ J Biochem 1988 Vol 171 P 479-484
- 244 Blundell T Wood S // Annu Rev Biochem 1982 Vol 51 P 123-154
- 245 Севастьянова Н Н Попов Е М // Биооргани химия 1981 Т 7 С 189-199
- 246 Севастьянова Н Н Попов Е М // Там же С 518-523
- 247 Севастьянова Н Н Попов Е М // Там же 1979 Т 5 С 11-23
- 248 Попов Е М Севастьянова Н Н // Там же 1981 Т 7 С 1478-1485
- 249 Sevastyanova N N Popov E M // J Mol Struct 1980 Vol 65 P 125-140
- 250 Ахмедов Н А // Молекуляр биология 1986 Т 20 С 1547-1549
- 251 Ахмедов Н А Халилова Н М Попов Е М // Там же 1987 Т 21 С 159-163
- 252 Гогитидзе Т В Попов Е М // Биооргани химия 1993 Т 19 С 693-703
- 253 Плетнев В З Громов Э П Попов Е М // Там же 1975 Т 1 С 328-339
- 254 Громов Э П Плетнев В З Попов Е М // Там же 1976 Т 2 С 19-27
- 255 Попов Е М Линкин Г М // Молекуляр биология 1971 Т 5 С 624-636
- 256 Ахмедов Н А // Изв АН АЗССР Сер физ наук 1987 Т 8 С 94-97
- 257 Ахмедов Н А Ахвердиева Г А // Изв АН АЗССР Сер биол наук 1986 Т 6 С 118-123
- 258 Попов Е М Ахмедов Н А // Биооргани химия 1980 Т 6 С 1620-1631
- 259 Мзаревлов К Д // Биохимия 1988 Т 53 С 1156-1162
- 260 Агаева Г А Ахмедов Н А Попов Е М // Молекуляр биология 1987 Т 21 С 164-173
- 261 Ахмедов Н А Агаева Г А Попов Е М // Там же С 174-181
- 262 Попов Е Агаева Г А Ахмедов Н А // Там же С 182-188
- 263 Завальный А А Попов Е М // Там же 1982 Т 16 С 129-141
- 264 Попов Е М Годжаев Н М Измайлова Л И и др // Биооргани химия 1982 Т 8 С 776-816

265. Roulston E , De-Coen J L , Walter R // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1974 Vol. 71. P. 1142-1144
266. Zimmerman S S , Baum R , Scheraga H A // Intern. J. Peptide and Protein Res. 1982 Vol. 19 P. 143-152.
267. Blagdon D E , Revier J , Goodman M // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1973. Vol. 70. P. 1166-1168.
268. Burgess A W , Momany F A , Scheraga H A // Biopolymers. 1975 Vol. 14. P. 2645-2647.
269. Manavalan P. , Momany F A // Ibid. 1980. Vol. 19. P. 1943-1973.
270. Vicar J , Abillon E , Toma E // FEBS Lett. 1979. Vol. 97. P. 275-278.
271. Gerge J M. , Kler L.B // J. Theor. Biol. 1973. Vol. 40. P. 393-396.
272. Flurry R L , Abdulnur S F , Bopp J M. // Biopolymers. 1978. Vol. 17. P. 2679-2687.
273. Yamada T , Wako H , Saito N et al. // Intern. J. Peptide and Protein Res. 1976. Vol. 8. P. 607-614.
274. Бетинский Я П , Никифорович Г В. // Биоорганич. химия. 1979. Т. 5. С. 1581-1583.
275. Николайчук В В , Галактионов С.Г. , Цейтлин В.М. , Мухнева Л М // Там же 1983 Т. 9 С. 33-35.
276. Loew G H , Burt S K // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1978. Vol. 75. P. 7-11.
277. Puri S A , Scheraga H.A. // J. Mol. Biol. 1987 Vol. 196. P. 697-711.
278. Nikiforovich G V , Belinsh J R. , Podinsh L U , Chipens G I // Stud. biophys. 1981. Vol. 85 P. 107-112.
279. Галактионов С Г , Шерман С А , Шендерович М Д // Биоорганич. химия. 1977 Г 3 С. 1190-1197.
280. Momany F A // J. Amer. Chem. Soc. 1976. Vol. 98. P. 2990-3000
281. Premilat S , Maigret B // J. Phys. Chem. 1980. Vol. 84. P. 293-299.
282. Pincus M R , Klausner R D , Scheraga H A // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1982. Vol. 79 P. 3413-3417.
283. Pincus M R , Klausner R.D , Scheraga H A // Ibid. P. 5107-5110.
284. Ripoll D R , Scheraga H.A. // Biopolymers. 1990. Vol. 30. P. 165-170.
285. Olszewski K A. , Piela L , Scheraga H A // J. Phys. Chem. 1993 Vol. 97. P. 267-278.
286. Head-Gordon T , Stillinger F H // Biopolymers. 1993. Vol. 33. P. 293-296.
287. Terwilliger T C , Weissman L , Eisenberg D // Biophys. J. 1982. Vol. 37. P. 353-360.
288. Brown L R , Braun W. , Kumar A , Wuthrich K. // Ibid. P. 319-325.
289. Galaktionov S G , Marchall G R // Ibid. 1993. Vol. 65. P. 608-616.
290. Hopfinger A. // J. Macromol. 1971. Vol. 4. P. 731-740.
291. Nemethy G , Hodes Z I , Scheraga H A // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1978. Vol. 75. P. 5760-5766.
292. Dygert M , Go N , Scheraga H.A // Micromolecules. 1975. Vol. 8. P. 750-764.
293. Nemethy G , Scheraga H.A. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1984. Vol. 118. P. 643-660.
294. De Santis P , Liquori A M // Biopolymers. 1971. Vol. 10. P. 699-711.
295. Liquori A M , De Santis P , Kovacs A L , Mazzarella L // Nature. 1966. Vol. 211. P. 1039-1041
296. Momany F A , Vanderkooi G , Tuttle R W , Scheraga H.A // Biochemistry. 1969. Vol. 8 P. 744-750.
297. Scott R A , Vanderkooi G , Tuttle R W et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1967. Vol. 58 P. 2204-2209.
298. Ovchinnikov Yu A , Ivanov V.T , Bystrov V F et al. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1970 Vol. 39. P. 217-238.
299. Ovchinnikov Yu.A , Ivanov V T // Proteins. 1982 Vol. 5 P. 310-642.
300. Weintraub H , Van Lente F // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1974 Vol. 71 P. 4249-4254.
301. Hull S E , Karlsson R , Main P et al // Nature. 1978 Vol. 275 P. 206-209
302. Mirau P A , Bovey F.A // Book of abstracts. 199th National Meeting of the American Chemical Society, Boston, Sprng. 1990. Wash. (D C.), 1990. P. 58

Одно из главных положений теории пространственной организации белков состоит в предположении о наличии в нативных конформациях макромолекул согласованности ближних, средних и дальних взаимодействий (см. часть II). На этом утверждении строится поэтапный подход к априорному предсказанию трехмерных структур природных полипептидов, поскольку только при гармонии в белковой глобуле всех внутриостаточных и межостаточных невалентных взаимодействий атомов становится возможным и оправданным разделение конформационной проблемы белка на ряд связанных между собой менее громоздких проблем и их последовательное решение. Это же положение отражает суть термодинамической бифуркационной теории свертывания белковой цепи, объясняющей возможность, направленность и предел протекания по беспорядочно-поисковому механизму спонтанного, нелинейного неравновесного процесса сборки высокоорганизованной пространственной структуры из флуктуирующей полипептидной цепи.

Исследование конформационных возможностей олигопептидных белковых фрагментов в принципе не отличается от исследования молекул природных олигопептидов. Осложняющее обстоятельство возникает вследствие необходимости при анализе белковых фрагментов делать исчерпывающее заключение не только о конформационных состояниях, предпочтительных по ближним и средним взаимодействиям, но также о состояниях, удовлетворяющих условиям дальних взаимодействий, узнать которые заранее не представляется возможным. Следовательно, требуется, чтобы в набор отобранных по ближним и средним взаимодействиям конформаций каждого белкового фрагмента обязательно вошла бы та его единственная и неизвестная пока конформация, которая реализуется в нативной пространственной структуре белка под дополнительным воздействием контактов между удаленными по цепи остатками. Ясно, что она автоматически окажется среди низкоэнергетических конформаций свободного фрагмента только при отсутствии у белковой глобулы противоречий между средними и дальними взаимодействиями. Таким образом, вопрос о согласованности этих взаимодействий имеет решающее значение для апробации физической модели количественной конформационной теории белковых молекул.

Нативная конформация белка согласно такой модели представляет собой нечто вроде ассоциации олигопептидных молекул, находящихся в конформациях, отвечающих низкоэнергетическим состояниям каждой из них и одновременно обеспечивающих плотнейшую упаковку белковой

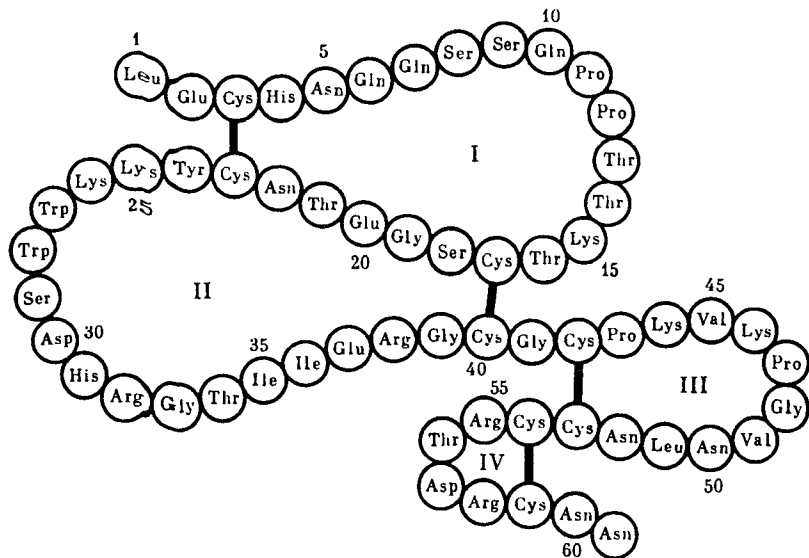
глобулы, т.е. образующих наибольшее количество стабилизирующих контактов между собой и с соединяющими их последовательностями. Изолированные конформационно жесткие белковые фрагменты, лишенные дополнительной внешней стабилизации, имеют структурную организацию, полностью соответствующую структурной организации природных олигопептидных молекул. Так утверждает теория (см. часть II). Полученные на ее основе результаты расчета конформационных возможностей десятков пептидов не только не вступили с ней в противоречие, но, напротив, полностью подтвердили ее фундаментальные положения о возможности реализации единичных структур, согласованных в отношении всех видов невалентных взаимодействий атомов и обладающих наименьшей энергией, а также об альтернировании вдоль аминокислотной последовательности конформационно жестких и конформационно лабильных участков (см. часть III).

Следующая задача, рассматриваемая в этой части книги, заключается в апробации бифуркационной теории свертывания и физической теории структурной организации непосредственно на белках путем априорного расчета их нативных конформаций по известной аминокислотной последовательности. Впервые эта задача решалась А.А. Завальным и мною при исследовании конформационных возможностей фрагмента Leu¹–Cys²³ низкомолекулярного белка нейротоксина II [1].

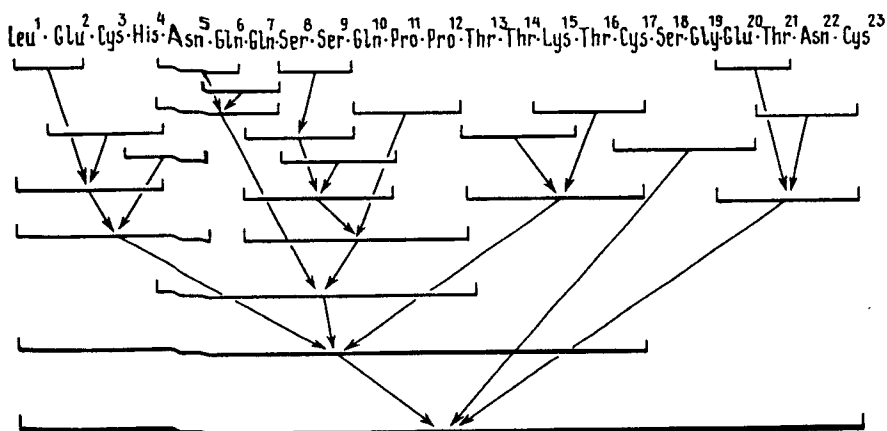
Глава 15

АПРИОРНЫЙ РАСЧЕТ ТРЕХМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ N-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА (1–23) НЕЙРОТОКСИНА II

Нейротоксин II выделен из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana*. Он относится к семейству белков змеиного яда, ингибирующих никотиновый ацетилхолиновый рецептор, препятствуя тем самым передаче нервного импульса через постсинаптическую мембрану. Аминокислотная последовательность нейротоксина II состоит из 61 аминокислотного остатка, в том числе 8 Cys, образующих четыре дисульфидных мостика: Cys³–Cys²³, Cys¹⁷–Cys⁴⁰, Cys⁴²–Cys⁵³ и Cys⁵⁴–Cys⁵⁹ (рис. IV.1). Данные о трехмерной структуре молекулы отсутствуют. Однако в литературе опубликованы результаты рентгеноструктурного анализа гомологов нейротоксина II, выделенных из яда морской змеи *Laticanda semifaciata* (нейротоксины *a* и *b*, эрабутоксины) [2–5]. Они состоят из 62 остатков и близки между собой по химическому и пространственному строению. В отмеченных работах описание структур носит качественный характер, выдержанный в терминах вторичных регулярных структур. Позднее стала известна кристаллическая структура эрабутоксина *b* с разрешением 2,5 Å [6]. В этом белке дисульфидные циклы Cys³–Cys²³ и Cys¹⁷–Cys⁴¹ содержат на один аминокислотный



Р и с. IV.1. Аминокислотная последовательность нейротоксина II из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana*



Р и с. IV.2. Схема расчета оптимальных конформаций фрагмента Leu¹-Cys²³ нейротоксина II

остаток больше, чем соответствующие циклы в рассматриваемом здесь нейротоксине II. Таким образом, здесь впервые оказалось возможным сопоставить результаты априорного расчета конформационных состояний сложного белкового фрагмента непосредственно с опытными данными о трехмерной структуре белка, правда, гомологичного, а не рассчитанного. Конформационный анализ фрагмента Leu¹-Cys²³ выполнен по схеме, представленной на рис. IV.2. Опуская все предшествующие стадии расчета,

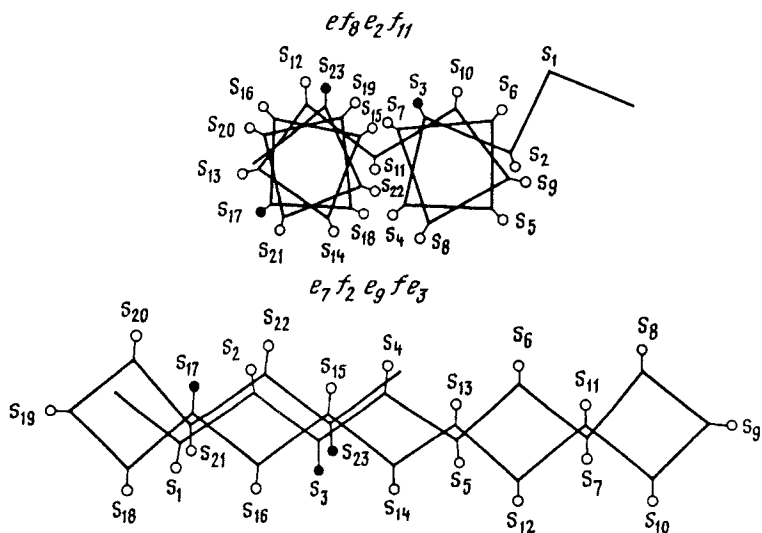
Таблица IV.1.

Низкоэнергетические конформации фрагмента Leu¹-Cys²³ нейротоксина II

Шейп	Конформация	U _{общ.} ккал/моль
$e_2 f_7 e_2 f_5$	f_6 $R_{21}^1 - L_{311}^2 - R_2^3 - R_{11}^4 - R_{23}^5 - R_{331}^6 - R_{311}^7 - R_{32}^8 - R_{22}^9 - B_{231}^{10} - B^{11} - R^{12} - R_{32}^{13} - R_{12}^{14} - R_{2222}^{15} - R_{32}^{16}$	$R_2^{17} - R_{22}^{18} - R^{19} - R_{211}^{20} - R_{32}^{21} - R_{13}^{22} - R_2^{23}$ 0,2
	ef_5	$B_2 - R_{22} - R - R_{211} - R_{32} - R_{13} - R_2$ 6,6
$e_2 f_2 e_7$	$f_2 ef_3$	$R_2^{17} - R_{22}^{18} - L^{19} - R_{211}^{20} - R_{12}^{21} - R_{13}^{22} - B_2^{23}$ 0
	$f_2 ef_2 e$	$R_2 - B_{22} - L - R_{221} - R_{12} - R_{13} - L_2$ 1,5
	$e_2 f e_3$	$B_2 - B_{22} - R - B_{211} - B_{32} - B_{11} - B_2$ 2,6
	$f ef_4$	$R_2 - B_{22} - R - R_{221} - R_{12} - B_{33} - L_2$ 3,5
	$f ef_3 e$	$R_2 - B_{22} - R - R_{311} - R_{12} - B_{33} - B_2$ 3,5
	$B_{21}^1 - B_{211}^2 - B_2^3 - B_{31}^4 - B_{21}^5 - B_{321}^6 - B_{321}^7 - R_{12}^8 - R_{12}^9 - B_{321}^{10} - B^{11} - B^{12} - B_{32}^{13} - B_{12}^{14} - B_{3222}^{15} - B_{32}^{16}$	
	$e_2 f_2 ef$	$R_2 - L_{22} - R - R_{221} - B_{32} - R_{13} - B_2$ 5,4
	$f_2 efef$	$R_2 - B_{22} - L - R_{221} - B_{22} - R_{13} - B_2$ 6,0
	$f_2 ef e_2$	$R_2 - B_{32} - L - R_{211} - B_{32} - R_{33} - B_2$ 6,6
	$e_2 f_2 ef$	$R_2 - L_{22} - R - R_{221} - B_{22} - B_{13} - L_2$ 7,7
	$f_2 e f_2$	$R_2 - B_{22} - L - B_{311} - R_{12} - R_{13} - B_2$ 9,0

остановимся сразу на результатах завершающего этапа анализа фрагмента $\text{Leu}^1\text{--Cys}^{17}$. Его 450 исходных структурных вариантов были сформированы из низкоэнергетических состояний фрагментов $\text{Leu}^1\text{--Asn}^5$, $\text{Asn}^5\text{--Pro}^{12}$ и $\text{Thr}^{13}\text{--Cys}^{17}$. Минимизация энергии при вариации всех двугранных углов ϕ , ψ , ω и χ выявила у $\text{Leu}^1\text{--Cys}^{17}$ две группы практически эквивалентных по энергии конформаций α -спирального и β -структурного типов. Лучшая конформация первой группы ($U_{\text{общ}} = 0$), имеющая форму основной цепи $\text{R}^1\text{--L}^2\text{--R}^3\text{--R}^4\text{--R}^5\text{--R}^6\text{--R}^7\text{--R}^8\text{--R}^9\text{--V}^{10}\text{--B}^{11}\text{--R}^{12}\text{--R}^{13}\text{--R}^{14}\text{--R}^{15}\text{--R}^{16}\text{--R}^{17}$ шейпа $e_2f_1e_2f_5$, состоит из двух коротких α -спиральных сегментов $\text{Cys}^3\text{--Gln}^{10}$ и $\text{Pro}^{12}\text{--Cys}^{17}$, соединенных развернутым участком $\text{Gln}^{10}\text{--Pro}^{11}\text{--Pro}^{12}$. Самая предпочтительная конформация второй группы ($U_{\text{общ}} = 2,7$ ккал/моль) представляет собой антипараллельную β -структуру формы $\text{B}^1\text{--B}^2\text{--B}^3\text{--B}^4\text{--B}^5\text{--B}^6\text{--B}^7\text{--R}^8\text{--R}^9\text{--V}^{10}\text{--B}^{11}\text{--B}^{12}\text{--B}^{13}\text{--B}^{14}\text{--B}^{15}\text{--B}^{16}\text{--B}^{17}$ шейпа $e_1f_2e_7$. В обоих случаях любое изменение формы пептидного остова ведет к резкому увеличению энергии. Особенно значительно оно при нарушении центральной части фрагмента.

Для определения структуры $\text{Leu}^1\text{--Cys}^{23}$ необходимо выяснить конформационные возможности фрагмента $\text{Cys}^{17}\text{--Cys}^{23}$ сначала в его свободном состоянии, а затем в потенциальном поле наиболее предпочтительных структурных вариантов α - и β -групп гептадекапептида $\text{Leu}^1\text{--Cys}^{23}$. Для этого были отобраны низкоэнергетические конформационные состояния 128 различных форм основной цепи $\text{Cys}^{17}\text{--Cys}^{23}$. Полученные результаты свидетельствуют о резкой энергетической дифференциации конформаций. В интервал 0–5 ккал/моль попали лишь 6, а в интервал 0–10 ккал/моль – 12 структур $\text{Leu}^1\text{--Cys}^{23}$. Они приведены в табл. IV.1, а на рис. IV.3 схематически изображены шейки пептидного скелета конформаций с относительной энергией $U_{\text{общ}} = 0,2$ и 2,6 ккал/моль. Среди наиболее предпочтительных состояний фрагмента имеются варианты как α -спирального, так и β -структурного типа. Однако вероятность их реализации различна. Если α -спиральная форма основной цепи представлена только одной низкоэнергетической конформацией ($U_{\text{общ}} = 0,2$ ккал/моль), то β -форма – семейством близких по энергии структурных вариантов, в том числе глобальной структурой ($U_{\text{общ}} = 0$). В первой группе конформаций любое изменение состояния $\text{Cys}^{17}\text{--Cys}^{23}$, ведущее к обрыву α -спирального сегмента, приводит к значительной дестабилизации. У конформаций второй группы, напротив, С-концевой гептапептидный фрагмент подвижен и при различных формах основной цепи может образовывать эффективные стабилизирующие контакты с β -структурным участком $\text{Leu}^1\text{--Cys}^{17}$. Так, в глобальной конформации $\text{Leu}^1\text{--Cys}^{23}$ энергия взаимодействия $\text{Cys}^{17}\text{--Cys}^{23}$ с N-концевым участком $\text{Leu}^1\text{--His}^4$ составляет –11,7 ккал/моль, а с $\text{Lys}^{15}\text{--Thr}^{16}$ – 17,2 ккал/моль. Наибольший вклад вносит остаток Glu^{20} , взаимодействия которого с Leu^1 , His^4 и Lys^{15} равны соответственно –2,5, –4,2 и –9,2 ккал/моль. В другой низкоэнергетической конформации β -группы ($U_{\text{общ}} = 2,6$ ккал/моль) энергия стабилизирующих контактов $\text{Cys}^{17}\text{--Cys}^{23}$ с $\text{Leu}^1\text{--His}^4$ и $\text{Lys}^{15}\text{--Thr}^{16}$ составляет –27,1 и –2,1 ккал/моль.

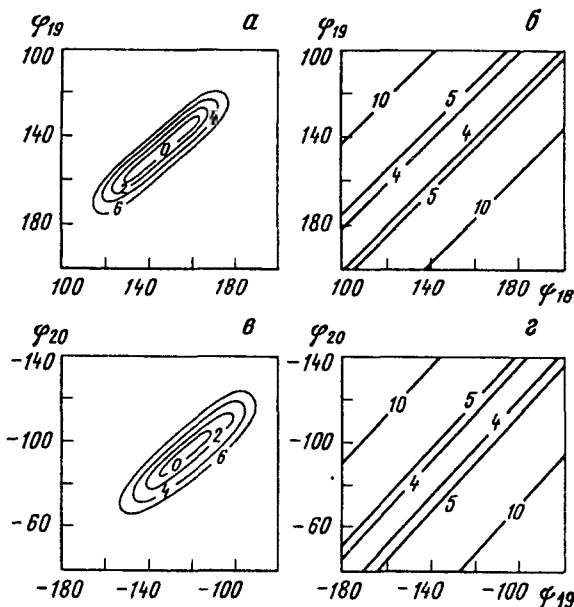


Р и с. IV.3. Шейлы пептидного скелета конформаций фрагмента $\text{Leu}^1\text{--Cys}^{23}$ нейротоксина II с относительной энергией $U_{\text{общ}} = 0,2$ и $2,6$ ккал/моль (см. табл. IV.1)

Итак, решение конформационной задачи для линейной последовательности $\text{Leu}^1\text{--Cys}^{23}$ привело нас к рассмотрению одного из наиболее интересных вопросов пространственной организации белковых молекул. Он касается конформационных аспектов образования дисульфидных связей и их роли в стабилизации трехмерной структуры белка. В исследовании пространственного строения нейротоксина II, как и в исследовании всех других цистинсодержащих пептидов (см. гл. 10), мы исходили только из известного химического строения белка, не делая каких-либо предположений о сближенности соответствующих остатков Cys и наличии четырех дисульфидных связей в молекуле. Предполагалось, что механизм свертывания белковой цепи является детерминированным, причем таким образом, что стерически возможными или энергетически наиболее предпочтительными становятся взаимодействия между вполне определенными остатками Cys. При справедливости этой гипотезы и правильности положенной в основу расчета нейротоксина II теории пространственной организации белка, а также при адекватности используемых потенциальных функций реальным атом-атомным взаимодействиям конформационный анализ линейной последовательности должен автоматически привести к установлению соответствующих цистеиновых пар. Рассмотрев конформационные возможности фрагмента $\text{Leu}^1\text{--Cys}^{23}$, мы сможем оценить достоверность результатов расчета и отмеченных общих положений. Последовательность $\text{Leu}^1\text{--Cys}^{23}$ содержит три остатка цистеина, которые могут образовывать одну из трех дисульфидных связей $\text{Cys}^3\text{--Cys}^{17}$, $\text{Cys}^{17}\text{--Cys}^{23}$, $\text{Cys}^3\text{--Cys}^{23}$ или оставаться вне взаимодействия. Рассмотрим возможности создания S-S-мостиков у низкоэнергетических конформаций фрагмента, представленных в табл. IV.1. У двух конфор-

маций α -спирального типа образование дисульфидных мостиков $\text{Cys}^3\text{--Cys}^{17}$ и $\text{Cys}^3\text{--Cys}^{23}$ невозможно из-за большой удаленности атомов серы (>20 Å). Остатки Cys^{17} и Cys^{23} находятся на меньшем расстоянии (~ 10 Å), но и здесь вследствие большой жесткости α -спиральной структуры сближение атомов S на валентное расстояние ($2,04$ Å) и образование мостика $\text{Cys}^{17}\text{--Cys}^{23}$ нереальны. Таким образом, у α -спиральных конформаций $\text{Leu}^1\text{--Cys}^{23}$ отсутствует предрасположенность к созданию дисульфидной связи. Аналогичной проверке подверглись все конформации β -структурного типа. Было выяснено, что ни одна из них не может образовывать дисульфидные связи $\text{Cys}^3\text{--Cys}^{17}$ и $\text{Cys}^{17}\text{--Cys}^{23}$. Соответствующие остатки расположены далеко друг от друга, их сближение приводит к рассогласованию многих стабилизирующих контактов и, как следствие, к резкому увеличению конформационной энергии. В отношении S-S-мостика между Cys^3 и Cys^{23} структуры этого типа ведут себя различно. У большинства конформаций расстояния между атомами C^β боковых цепей цистеинов превышают 16 Å, и все попытки образовать дисульфидную связь оказались безуспешными. Исключение составляет конформация с $U_{\text{общ}} = 2,6$ ккал/моль (см. табл. IV.1). У нее C-концевой фрагмент $\text{Cys}^{17}\text{--Cys}^{23}$ огибает жесткий пептидный каркас, образуя кросс- β -структуру (см. рис. IV.3). В отмеченной структуре атомы C^β остатков Cys^3 и Cys^{23} находятся на расстоянии $5,5$ Å, что лишь на $1\text{--}2$ Å превышает расстояние $\text{C}^\beta\cdots\text{C}^\beta$ в дисульфидном мостике.

Образование S-S-связи неизбежно сопряжено с изменениями (в данном случае незначительными) двугранных углов линейной конформации. Чтобы они не оказались случайными, а были согласованы между собой и не вызывали дестабилизацию невалентных контактов, сложившихся в этих структурах, были исследованы сечения потенциальной поверхности и установлена зависимость между значениями двугранных углов фрагмента $\text{Cys}^{17}\text{--Cys}^{23}$ и расстоянием $\text{C}_{(3)}^\beta\cdots\text{C}_{(23)}^\beta$. Из общих соображений очевидно, что сближение атомов серы нецелесообразно осуществлять за счет изменения параметров участка $\text{Glu}^{20}\text{--Thr}^{21}\text{--Asn}^{22}\text{--Cys}^{23}$, имеющего комплементарную к структуре $\text{Leu}^1\text{--His}^4$ форму основной цепи $\text{B}^{20}\text{--B}^{21}\text{--B}^{22}\text{--B}^{23}$. Для этого более подходят двугранные углы фрагмента $\text{Ser}^{18}\text{--Gly}^{19}\text{--Glu}^{20}$. Согласованные между собой конформационные карты $\Phi_{19}\text{--}\Psi_{18}$ и $\Phi_{20}\text{--}\Psi_{19}$ для структуры с $U_{\text{общ}} = 2,6$ ккал/моль приведены на рис. IV.4, а, в. Области низкой энергии на обоих картах имеют форму узких вытянутых желобов, что свидетельствует о линейной зависимости между значениями углов Ψ_{18} и Φ_{19} и между Ψ_{19} и Φ_{20} . На рис. IV, б, г приведены в тех же координатах расстояния $\text{C}_{(3)}^\beta\cdots\text{C}_{(23)}^\beta$. Сопоставление позиций а, б с позициями в, г свидетельствует о симбатности изменений потенциальной энергии и расстояния $\text{C}_{(3)}^\beta\cdots\text{C}_{(23)}^\beta$ в зависимости от значений двугранных углов Ψ_{18} , Φ_{19} , Ψ_{19} , Φ_{20} . При совмещении позиций а, в и б, г низкоэнергетические желоба попадают точно в области минимальных расстояний между остатками Cys^3 и Cys^{23} . Таким образом, линейная последовательность $\text{Leu}^1\text{--Cys}^{23}$ обладает предрасположенностью к такому формированию, которое неизбежно ведет к сближению остатков Cys^3 и



Р и с. IV.4. Зависимость конформационной энергии (а, в) и расстояния между атомами $C_{(3)}^{\beta}$ и $C_{(23)}^{\beta}$ (б, г) от значений двугранных углов $\Phi_{19}-\Psi_{18}$ и $\Phi_{20}-\Psi_{19}$ в оптимальной линейной конформации фрагмента Leu^1-Cys^{23}

Энергия в ккал/моль; расстояние в Å, углы в град

Cys^{23} и к образованию между ними дисульфидной связи, не вызывающей нарушения ранее сложившихся благоприятных взаимодействий.

После выбора оптимального расстояния $C_{(3)}^{\beta} \dots C_{(23)}^{\beta}$ ($\sim 4,0$ Å) и минимизации энергии с несколько измененными исходными значениями углов Ψ_{18} , Φ_{19} , Ψ_{19} , Φ_{20} строились конформационные карты $\chi_1^3 - \chi_1^{23}$ в поле конформации с $U_{общ} = 2,6$ ккал/моль. На их основе были подготовлены наиболее выгодные для дисульфидной связи взаимные ориентации боковых цепей Cys^3 и Cys^{23} . Глобальная циклическая конформация фрагмента нейротоксина Leu^1-Cys^{23} с формой основной цепи $B^{17}-B^{18}-R^{19}-B^{20}-B^{21}-B^{22}-B^{23}$ и значениями углов $\chi_1^3, \chi_1^{23} \sim 180, -60^\circ$ обладает доминирующей предпочтительностью в сравнении с альтернативными структурными вариантами. Абсолютная энергия ее стабилизирующих взаимодействий ($-99,8$ ккал/моль) практически совпадает с энергией, соответствующей конформации линейной последовательности ($-100,7$ ккал/моль, $U_{общ} = 2,6$ ккал/моль), а расчетные значения параметров дисульфидной связи — с экспериментальными величинами (2,04 Å для S-S и 3,05 Å для $C^{\beta} \dots S$). Угол вращения $\chi^{S-S} \sim -110^\circ$ отвечает промежуточному между *gauche* ($\pm 90^\circ$)- и *транс* (180°)-расположениями связей $C_{(3)}^{\beta}-S_{(3)}$ и $C_{(23)}^{\beta}-S_{(23)}$. Таким образом, теоретический конформационный анализ участка нейротоксина

Leu¹-Cys²³ показал, что для него реальной является лишь одна циклическая структура.

х. Структурные данные об участке нейротоксина Leu¹-Cys²³ и результаты исследования конформационных возможностей большого числа его постепенно усложняющихся фрагментов позволяют следующим образом описать механизм укладки белковой цепи из полностью развернутого состояния в глобальную циклическую конформацию. Формирование структуры начинается с октапептидного участка Asp⁵-Pro¹². Его самая выгодная конформация шейпа $e_3f_2e_2$ входит в глобальную конформацию фрагмента Leu¹-Cys²³. Предшествующий ему и последующий пентапептидные фрагменты Leu¹-Asn⁵ и Thr¹³-Cys¹⁷ обладают в изолированном состоянии большой конформационной свободой. Важно, однако, что среди низкоэнергетических вариантов имеются конформации с полностью развернутыми формами основной цепи. Именно они оказываются наиболее предпочтительными для Leu¹-Asn⁵ и Thr¹³-Cys¹⁷ при состыковке с Asp⁵-Pro¹² в конформации типа $e_3f_2e_2$. В результате у фрагмента Leu¹-Cys¹⁷ образуется антипараллельная β -структура, с которой по величине энергии (но не энтропии!) может конкурировать только одна конформация, состоящая из двух коротких α -спиральных сегментов (см. рис. IV.3). Дальние взаимодействия в такой структуре между фрагментами Leu¹-Asn⁵ и Thr¹³-Cys¹⁷ не только детерминируют у них развернутые формы основной цепи, но и дополнительно стабилизируют конформационное состояние октапептида Asp⁵-Pro¹². Это приводит к образованию у фрагмента Leu¹-Cys¹⁷ конформационно жесткой структуры – нуклеации. Для следующего участка нейротоксина Cys¹⁷-Cys²³, отличающегося также большой подвижностью, нуклеация Leu¹-Cys¹⁷ служит матрицей, которая детерминирует у него несколько близких по энергии конформационных состояний (см. табл. IV.1). Образование дисульфидной связи между Cys³ и Cys²³ делает реальной для Leu¹-Cys²³ лишь одну конформацию.

Сравнение геометрических и энергетических характеристик линейной и циклической конформации Leu¹-Cys²³ показывает, что создание дисульфидного мостика не нарушило ни одного стабилизирующего контакта между остатками. Необходимые для сближения атомов S₍₃₎ и S₍₂₃₎ изменения двугранных углов оказались незначительными (<10°) и коснулись лишь наиболее лабильного участка Ser¹⁸-Gly¹⁹-Glu²⁰. Расчет, таким образом, показал, что в основе спонтанного и безошибочного образования дисульфидной связи лежат конформационные аспекты. Валентному связыванию цистеинов предшествует создание на одном конце фрагмента конформационно жесткой нуклеации, а на другом, более коротком, – лабильного участка. При сложившейся нуклеации в одной из самых предпочтительных конформаций лабильного участка атомы серы вступают во взаимодействие. Два резко различающихся по конформационным свойствам участка выполняют в создании дисульфидной связи различные функции, в равной мере необходимые для того, чтобы этот процесс совершался быстро, спонтанно и безошибочно. Благодаря нуклеации он становится не статистическим, а детерминированным. Конформационно лабильный участок легко локализует и делает низкоэнергетическими все изменения геометрии пептидной цепи, необходимые для сближения остат-

ков Cys и образования связи S—S. Изложенные конформационные аспекты не являются специфическими только в отношении дисульфидных связей, а отвечают общему механизму пространственной организации белковых молекул. Итак, расчет белкового фрагмента Leu¹—Cys²³, как и расчеты ряда сложных цистинсодержащих олигопептидов (см. гл. 10), выполненные на основе конформационной теории, в которой нет специальных положений о дисульфидных связях, во всех случаях априорно правильно предсказывают места их локализации в нативных структурах.

В рассчитанной циклической структуре фрагмента нейротоксина Leu¹—Cys²³ реализуется типичная для β-структуры система пептидных водородных связей. Для конформации Leu¹—Cys²³ с дисульфидной связью получены сечения потенциальной поверхности χ_1 — χ_2 боковых цепей остатков. Ранее такие сечения были исследованы у конформации фрагмента Leu¹—Cys¹⁷, которая входит в циклическую структуру у Leu¹—Cys²³. Отметим, что присоединение гептапептида Cys¹⁷—Cys²³ не изменило конформационную подвижность остатков His⁴—Cys¹⁷ по сравнению со свободным участком Leu¹—Cys¹⁷. У боковых цепей Leu¹ и Glu² в циклической структуре локальные минимумы (~5,0 ккал/моль) соответственно при $\chi_1, \chi_2 \sim -150, -60$ и $60, 180^\circ$ становятся еще более высокоэнергетичными из-за наталкивания на Cys²³ в первом случае и на Asn²² — во втором. Анализ сечений потенциальной поверхности χ_1 — χ_2 остатков Ser¹⁸, Glu²⁰, Asn²² конформационно лабильного участка Cys¹⁷—Cys²³ показал, что боковые цепи, особенно серина, обладают значительной подвижностью и могут принимать несколько практически изоэнергетических ориентаций. У боковой цепи Thr²¹ свобода по углу χ_1 ограничена одной областью (~ -60°).

Сопоставим теперь априорно рассчитанную конформацию циклического фрагмента нейротоксина II Leu¹—Cys²³ с экспериментом. Как отмечалось, кристаллическая структура этого белка неизвестна. Но в 1979 г. были опубликованы рентгеноструктурные данные, касающиеся гомологичного белка эрабутоксина *b* [6]. Его аминокислотная последовательность содержит не 61 остаток, а 62, причем интересующий нас фрагмент имеет на один остаток больше и скреплен дисульфидной связью Cys³—Cys²⁴. Последовательность эрабутоксина на участке 1—17 отличается от нейротоксина четырьмя остатками: Arg¹ (у нейротоксина Leu¹), Phe⁴ (His⁴), His⁷ (Gln⁷) и Gln¹² (Pro¹²). Наиболее существенные замены и удлинение цепи имеют место на участке Cys¹⁷—Cys²³ (у эрабутоксина Cys¹⁷—Cys²⁴), т.е. в той части последовательности, которая, согласно расчету, характеризуется наибольшей лабильностью и при образовании дисульфидной связи подстраивается под конформационно жесткую нуклеадию — антипараллельную β-структуру Leu¹—Cys¹⁷.

В табл. IV.2 сопоставлены расстояния между атомами C^α в теоретической структуре свободного циклического фрагмента нейротоксина Leu¹—Cys²³ и в экспериментальной структуре фрагмента Arg¹—Cys²⁴ в молекуле эрабутоксина. В левой и центральной частях таблицы приведены расстояния между атомами C_i^α...C_j^α, количественно характеризующие конформацию участков Leu¹—Cys¹⁷ и Arg¹—Cys¹⁷ в двух белках. В качестве таковых выбраны расстояния между противостоящими в β-струк-

Расстояния между атомами C^α в теоретической конформации фрагмента
 Leu¹-Cys²³ нейротоксина II и кристаллической структуре
 фрагмента эрабутоксина на участке Arg¹-Cys²⁴

Атомы C ^α	Расстояние, Å	Атомы C ^α	Расстояние, Å	Атомы C ^α	Расстояние, Å
(1)...(17)	5,0	(8)...(10)	5,5	(2)...(23)	7,7
	6,0		5,6	(2)...(24)	8,5
(2)...(16)	5,6	(9)...(1)	21,0	(3)...(23)	5,7
	4,6		20,6	(3)...(24)	6,5
(3)...(15)	5,1	(9)...(17)	23,2	(4)...(23)	8,2
	6,2		21,2	(4)...(24)	8,4
(4)...(14)	4,6	(1)...(21)	5,7	(16)...(22)	11,6
	4,5	(1)...(22)	6,5	(16)...(23)	11,3
(5)...(13)	5,1	(1)...(22)	6,6	(16)...(23)	11,9
	5,6	(1)...(23)	6,7	(16)...(24)	11,1
(6)...(12)	5,6	(1)...(23)	8,4	(17)...(22)	11,1
	4,8	(1)...(24)	8,0	(17)...(23)	9,7
(7)...(11)	5,4	(2)...(22)	6,2	(17)...(23)	12,4
	5,4	(2)...(23)	8,9	(17)...(24)	10,0
(7)...(9)	5,6				
	6,1				

Примечание. Для каждого положения атомов C^α первое значение расстояния относится к нейротоксину II, второе – к эрабутоксину *b*. Числа в скобках – номера аминокислотных остатков.

туре остатками (1–17, 2–16, ..., 7–11), между остатками, входящими в β-изгиб (7–9, 8–10), и между остатком в вершине β-шпильки и двумя остатками на ее концах (9–1, 9–17). Сравнение свидетельствует о хорошем совпадении результатов расчета с экспериментальными данными. Среднее отклонение составляет <0,7 Å, т.е. практически совпадает с разрешающей способностью рентгеноструктурного анализа эрабутоксина. Наибольшее различие (2 Å) наблюдается между атомами C^α остатков Ser⁹ (вершина шпильки) и Cys¹⁷ (С-конец шпильки). По-видимому, это отражает реальную ситуацию и связано с наличием у эрабутоксина дополнительного остатка Pro¹⁸, смежного с Cys¹⁷. В правой части табл. IV.2 сопоставлена геометрия участков Cys¹⁷–Cys²³ и Cys¹⁷–Cys²⁴. Среднее отклонение здесь по понятным причинам несколько больше, однако и оно не превышает 1 Å. Наибольшие различия (2,4 и 2,7 Å) наблюдаются между атомами C^α остатков Cys¹⁷ и Cys²³ (Cys²⁴), что также, вероятно, связано с включением в эрабутоксин Pro¹⁸, и атомами C^α остатков Glu² и Asn²² (Ser²³). В целом же точность совпадения результатов теоретического анализа с опытными данными следует признать удовлетворительной. То обстоятельство, что конформация цикла Leu¹–Cys²³, полученная только при учете взаимодействий между входящими в него остатками, не претерпевает заметных изменений при включении его в трехмерную структуру белка, где реализуется целый ряд новых контак-

тов, указывает на наличие у эволюционно отобранной аминокислотной последовательности весьма совершенной согласованности между всеми внутри- и межостаточными взаимодействиями.

Изучение конформационных возможностей участка нейротоксина II Leu¹-Cys²³ позволяет выяснить роль отдельных аминокислотных остатков и оценить влияние мутагенеза на формирование трехмерной структуры белка. На основе полученных данных были рассчитаны конформационные состояния участка 1–23 следующих гомологичных нейротоксинов: α , D, 4, CM-14 и β . Они содержат по 61 остатку и имеют такую же, как у нейротоксина II, систему дисульфидных связей. На участке 1–23 перечисленных белков насчитывается от одной до пяти замен. Ниже рассматривается влияние этих замен на рассчитанную структуру циклического фрагмента нейротоксина II Leu¹-Cys²³.

У нейротоксина α , как и у остальных четырех гомологичных белков, вместо остатка Ser¹⁸ находится Pro¹⁸. Такая замена делает невозможной реализацию R-состояния у предшествующего остатка Cys¹⁷, что приводит к дискриминации α -спиральных структур и 9 из 10 β -структур, представленных в табл. IV.1. В эту группу не входит циклическая конформация Leu¹-Cys²³, в которой Cys¹⁷ находится в B-состоянии. В линейном варианте гомологичных белков (с Pro¹⁸) она становится глобальной. В циклической конформации фрагмента нейротоксина II Leu¹-Cys²³ остаток Ser¹⁸ имеет угол $\phi = -67,2^\circ$, т.е. близкий к фиксированному углу $\phi = -57,6^\circ$ для пролина, а угол $\psi = 151,3^\circ$ у Ser¹⁸ находится в области, дозволенной для пролина. Расчет линейного и циклического фрагментов Leu¹-Cys²³ нейротоксина показал, что включение Pro¹⁸ вместо Ser¹⁸ не вызывает стерических затруднений, не изменяет конфигурацию дисульфидного мостика и лишь незначительно сказывается на значении угла ψ (Cys¹⁷), который изменяется с $134,5$ до $124,9^\circ$. Абсолютная конформационная энергия и величины стабилизирующих межостаточных взаимодействий в структурах нейротоксинов II и α практически совпадают.

Последовательности нейротоксинов II и D на участке 1–23 различаются в двух местах: Leu¹ заменен на Met¹, Ser¹⁸ – на Pro¹⁸. Влияние пролина рассмотрено выше. Что касается другой замены, то она также не вызывает осложнений. Для определения положения боковой цепи Met¹ построена карта χ_1 - χ_2 (при $\chi_2 = 180^\circ$), из которой следует, что наиболее предпочтительная ориентация боковой цепи Met¹ отвечает углам χ_1 , $\chi_2 \sim 180, 180^\circ$ (у Leu¹ нейротоксина II $\sim 180, 60^\circ$). У нейротоксина 4 три остатка в рассматриваемом фрагменте отличаются от нейротоксина II (Thr¹¹, Gln¹⁵ и Pro¹⁸ вместо Pro¹¹, Lys¹⁵ и Ser¹⁸). Их основные цепи легко принимают значения углов ϕ , ψ соответствующих остатков исследованного фрагмента нейротоксина II, а боковые цепи включаются в его систему стабилизирующих контактов. Положения последних следуют из конформационных карт χ_1 - χ_2 для Thr¹¹ и Gln¹⁵, полученных в поле циклической структуры; у Thr¹¹ из-за соседства с Pro¹² приемлемо лишь одно значение угла $\chi_1 \sim 60^\circ$; у Gln¹⁵ наиболее предпочтительна ориентация боковой цепи $\chi_1, \chi_2 \sim 180, 60^\circ$ и $\chi_3 \sim 90^\circ$.

Нейротоксин CM-14 на участке 1–23 содержит следующие четыре замены: Met¹, Ile², Ile¹⁴ и Pro¹⁸ вместо Leu¹, Glu², Thr¹⁴ и Ser¹⁸.

Информационные возможности боковой цепи Met¹ в этом белке удовлетворительно передает карта χ_1 - χ_2 , полученная для нейротоксина D. Замена Glu² и Ile², как показало сопоставление соответствующих сечений потенциальной поверхности, сопровождается ослаблением взаимодействий боковых цепей нового остатка и His⁴ вследствие потери электростатического вклада; конформационная свобода Ile² ограничена, по существу, одной областью при $\chi_1, \chi_2 \sim 60, 180^\circ$. Малую подвижность имеет также боковая цепь Ile¹⁴; наиболее выгодная ее ориентация отвечает значениям $\chi_1, \chi_2 \sim 180, 180^\circ$, далее следует $\sim 60, 180^\circ$ и $\sim -60, 180^\circ$. Нейротоксин β отличается от CM-14 еще одной заменой Pro¹¹ на Arg¹¹. Влияние на конформацию участка Met¹-Cys²³ четырех других замещений аналогично рассмотренным случаям. Боковая цепь Arg¹¹ обладает большими конформационными возможностями в отношении углов χ_1, χ_2 при $\chi_3, \chi_4 \sim 180^\circ$, чем при $\chi_3 \sim 60$ и $\sim -60^\circ$. Самыми выгодными положениями боковой цепи (при $\chi_3, \chi_4 \sim 180^\circ$), являются $\chi_1, \chi_2 \sim -60, 180^\circ$ и $\sim -60, -60^\circ$. На 1,0-2,0 ккал/моль менее предпочтительно положение $\chi_1, \chi_2 \sim 60, 180^\circ$.

Таким образом, рассмотрение в свете результатов теоретического конформационного анализа фрагмента нейротоксина Leu¹-Cys²³ пяти гомологичных белков приводит к заключению, что различия в аминокислотных последовательностях участка 1-23 не сказываются на форме пептидного остова и конформации дисульфидного мостика Cys³-Cys²³. Все остатки гомологов свободно встраиваются в рассчитанную для нейротоксина II циклическую трехмерную структуру Leu¹-Cys²³, не вызывая ее дестабилизации. Принимаемые иногда новыми остатками иные положения боковых цепей также отвечают низкоэнергетическим областям χ_1 - χ_2 соответствующих остатков нейротоксина II, которые в этих случаях оказываются более предпочтительными. Следовательно, рассчитанная геометрия белкового остова предоставляет возможность реализации у различающихся аминокислот в эволюционно отобранных последовательностях нейротоксинов ряда конформационных состояний. Для всех гомологов найденная структура фрагмента 1-23 является глобальной.

Только что изложенные результаты исследования пространственного строения трикозапептидного N-концевого фрагмента нейротоксина представляют исключительный интерес для понимания принципов структурной организации белковых молекул и утверждения бифуркационной теории свертывания, физической конформационной теории и метода расчета *ab initio* на атомном уровне трехмерных структур. Перечислим наиболее важные вопросы самого общего порядка, в решении которых данные теоретического конформационного анализа участка Leu¹-Cys²³ нейротоксина II обретают принципиальное значение.

1. Впервые на количественном уровне доказано наличие согласованности в белковой глобуле всех ближних, средних и дальних невалентных взаимодействий. Глобальная конформация свободного фрагмента Leu¹-Cys²³ совпала (с экспериментальной точностью рентгеноструктурного анализа хорошего разрешения) с геометрией соответствующего участка в кристаллической структуре гомологичного белка, в которой остатки Leu¹-Cys²³ образуют, помимо учтенных в расчете, множество других контактов с остатками С-концевой части последовательности (Tyr²⁴-Asn⁶¹).

2. Выявлены функции ближних, средних и дальних взаимодействий, определяющих возможность, направленность и предел самопроизвольного процесса свертывания белковой цепи в нативную конформацию. Этот вопрос рассматривается (с привлечением экспериментальных данных и неравновесной термодинамической модели) в следующей главе после анализа результатов априорного расчета пространственной структуры молекулы бычьего панкреатического трипсинового ингибитора.

3. Расчет белкового фрагмента подтвердил вытекающие из конформационного анализа многих цистинсодержащих олигопептидов выводы о роли дисульфидных мостиков и механизме их образования. Можно считать доказанным, что автоматизм в создании S-S-связей в белковой глобуле обусловлен стерической предрасположенностью соответствующих участков аминокислотной последовательности к такому формообразованию, которое неизбежно ведет к сближенности определенных остатков цистеина и необходимой для окисления атомов серы взаимной ориентации их боковых цепей.

4. Впервые на теоретической количественной основе рассмотрены те особенности в структурной организации белковой последовательности, которые ответственны за консервативность геометрии основной цепи при многочисленных, однако всегда строго детерминированных (гомологичных) заменах аминокислот.

5. Совпадение результатов априорного расчета конформационных возможностей сложного белкового фрагмента с опытными данными о кристаллической структуре белка впервые убедительно подтвердило, во-первых, справедливость физической теории структурной организации белков, лежащей в основе данного расчета, и, во-вторых, реальность многостадийного подхода, использованных потенциальных функций и параметризации для количественной оценки невалентных взаимодействий, формирующих пространственную структуру белка.

Глава 16

АПРИОРНЫЙ РАСЧЕТ ТРЕХМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ МОЛЕКУЛЫ ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО ТРИПСИНОВОГО ИНГИБИТОРА

Успех в решении принципиально новой, носящей мировоззренческий характер научной проблемы во многом определяется следующими тремя обстоятельствами. Во-первых, творческой потенцией ученого, его неудовлетворенностью достигнутым, обостренным чувством нового, пониманием, поначалу, быть может, не в полной мере осознанным, необходимости и своевременности постановки данной проблемы, представлением, что именно она является следующим звеном в цепи познания. По-видимому,

такими качествами обладали и подобные чувства испытывали У. Астбэри и Дж. Бернал (1930-е годы) при постановке рентгеноструктурных исследований фибриллярных и глобулярных белков, Ф. Сенгер (1940–1950-е годы) при определении аминокислотной последовательности инсулина, Дж. Уотсон и Ф. Крик (1953 г.) при расшифровке структуры молекулы ДНК и другие исследователи – основоположники молекулярной биологии. Во-вторых, исследование проблемы зависит от умения представить ее в виде последовательного и постепенно усложняющегося ряда задач, в котором решение каждой предшествующей задачи делает реальным рассмотрение последующей. Классическими примерами здесь являются программы и методологические принципы Э. Фишера и Э. Вальдшмидт-Лейтца, которыми они руководствовались при разработке пептидной теории (первые годы XX в.) и ферментативном изучении строения белков (1930-е годы). В-третьих, решающим во многих случаях является удачный выбор объекта исследования, максимально простого и в то же время правильно отражающего суть изучаемого явления. Можно ли для решения рассматриваемой нами проблемы структурной организации белка иметь свою "мушку-дрозофилу" или штамм *E. coli*? Для этого, прежде всего, необходимо представлять, что в данном случае следует понимать под простейшим и одновременно типичным объектом, каким требованиям он должен удовлетворять.

Выбранный для первого в научной практике априорного расчета белковой трехмерной структуры объект, безусловно, должен быть низкомолекулярным, однодоменным, состоять из одной полипептидной цепи и являться прямым продуктом биосинтеза. Далее, его нативная конформация должна включать систему дисульфидных связей, поскольку в настоящее время эти связи служат, если и не единственным, то, во всяком случае, самым надежным источником информации о структуре промежуточных метастабильных состояний. Кроме того, для выяснения принципов пространственной организации белков существенный интерес представляют количественные оценки основных факторов стабилизации двух сравнительно часто встречающихся регулярных форм пептидной цепи – α -спирали и β -структуры. Поэтому желательно, чтобы пространственная структура выбранного для расчета белка содержала наряду с неупорядоченными участками также вторичные, регулярные структуры обоих видов. Понимание структурной организации белковых молекул не является конечной целью, а необходимо для последующего изучения их биологического действия, т.е. решения проблемы структурно-функциональной организации белков. Поэтому важно, чтобы белок, выбранный в качестве простейшего для изучения его структурной организации, оказался бы и удачным модельным объектом для установления принципов взаимосвязи между структурой и функцией. Он должен обладать простой и хорошо изученной экспериментально функцией.

Всем отмеченным требованиям удовлетворяет белковая молекула бычьего панкреатического трипсинового ингибитора (БПТИ). Решающее значение в выборе этого белка как тест-объекта сыграло то обстоятельство, что молекула БПТИ экспериментально и теоретически изучена почти во всех отношениях более глубоко и всесторонне, чем другие белки.

Не будет преувеличением сказать, что уровень исследования БПТИ во многом отражает сегодняшние экспериментальные и теоретические возможности естествознания в изучении белковых молекул. В частности, особенно важным оказалось то, что изучение механизма свертывания и разворачивания полипептидной цепи БПТИ, предпринятое Т.Крейтоном [7], безусловно, опережает все аналогичные работы по денатурации других белков. Аминокислотная последовательность БПТИ из 58 аминокислотных остатков была установлена Б. Касселем и М. Ласковским [8]. Трехмерная структура БПТИ с разрешением 1,9 Å получена Р. Хубером и соавт. [9] и уточнена до 1,5 Å Дж. Дайзенхофером и У. Стейгеманном [10]. Белок включает шесть остатков Cys, которые образуют три дисульфидные связи Cys⁵–Cys⁵⁵, Cys¹⁴–Cys³⁸ и Cys³⁰–Cys⁵¹. Конформационный анализ БПТИ [11], результаты которого рассматриваются в этой главе, проводился для линейной последовательности белка, так как априорный расчет должен автоматически привести к сближенности соответствующие остатки Cys в наиболее предпочтительной конформации.

16.1. РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА

Расчету трехмерной структуры БПТИ (рис. IV.5) предшествовал детальный анализ конформационных возможностей большого числа фрагментов, среди которых простейшими были дипептиды. В основу рассмотрения пространственного строения дипептидов положены низкоэнергетические конформации монопептидов (см. табл. II.17), полученные ранее из расчета соответствующих молекул метиламидов N-ацетил- α -аминокислот. Таким образом, выбор исходных конформационных состояний аминокислотных остатков не был связан с их геометрией в известной структуре БПТИ. Используемые в расчете наборы низкоэнергетических вариантов структур монопептидов являются универсальными при рассмотрении любых последовательностей. Количество конформационных состояний, учитываемых в начале расчета для каждого аминокислотного остатка, превышало число его конформаций, обнаруженных в белках известного строения.

Фрагмент Arg¹–Pro⁹. Начнем рассмотрение с результатов анализа N-концевого нонапептидного участка молекулы. На основе низкоэнергетических конформаций перекрывающихся дипептидов были исследованы структуры трипептидов Arg¹–Asp³, Pro²–Phe⁴, Phe⁴–Leu⁶ и тетрапептида Leu⁶–Pro⁹. Данные о конформационных состояниях первых двух трипептидов послужили исходными для расчета тетрапептида Arg¹–Phe⁴, который вместе с трипептидом Phe⁴–Leu⁶ стал базовым для анализа гексапептида Arg¹–Leu⁶. Знание конформационных возможностей гексапептида Arg¹–Leu⁶ и тетрапептида Leu⁶–Pro⁹ сделало реальным структурное исследование фрагмента Arg¹–Pro⁹. На основе полученных данных был составлен набор структур Arg¹–Pro⁹ для минимизации энергии при варьировании 43 двугранных углов ϕ , ψ , ω , χ , включающий 299 конформационных вариантов, которые распадаются на 24 шейпа. Энергетическое распределение полученных данных представлено в табл. IV.3. Результаты расчета свидетельствуют о резкой энергетической дифференциации

Рис. IV.5. Трехмерная структура БПТИ, полученная методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 1,5 Å [9, 10]

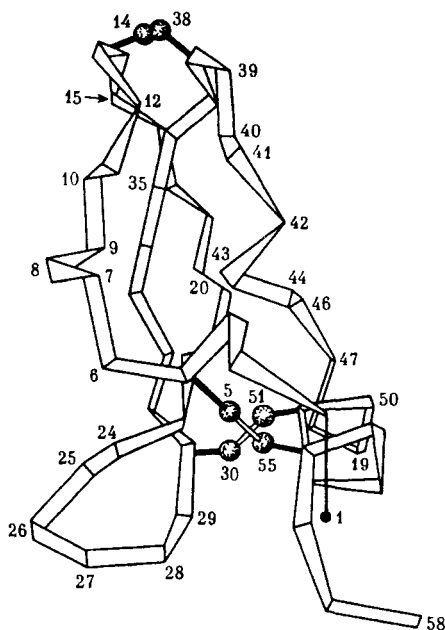
Показана структура остова молекулы

конформаций Arg¹-Pro⁹. В интервал 0–5,0 ккал/моль попадают лишь три конформации шейпа $e_2f_4e_2$, а в интервал 0–10,0 ккал/моль – 12, причем пять из них принадлежат одному шейпу. В чем же заключается причина столь четко проявившейся при состыковке двух лабильных фрагментов детерминации структуры нонапептида?

Рассмотрим, прежде всего, особенности глобальной конформации фрагмента B₁₂₂₁¹–B²–R₃₁³–R₁₁⁴–R₂⁵–R₃₂₁⁶–B₁₂₁⁶–B⁸–B⁹,

шейп которой $e_2f_4e_2$ представлен на рис. IV.6. Основная цепь этой конформации на начальном трипептидном участке развернута, затем образует примерно два витка неправильной спирали и удаляется в сторону, приобретая опять развернутый характер. При такой упаковке цепи имеет место сближенность почти всех аминокислотных остатков фрагмента и реализация тетра-, пента- и т.д. вплоть до октапептидных взаимодействий. Возникновение у глобальной конформации новых стабилизирующих контактов не нарушает взаимодействий, присущих соответствующим состояниям участков Arg¹-Leu⁶ и Leu⁶-Pro⁹, которые отвечают наиболее низкоэнергетическим конформациям свободных гекса- ($U_{\text{общ}} = 0,2$ ккал/моль) и тетрапептида ($U_{\text{общ}} = 1,7$ ккал/моль). Общий стабилизирующий эффект взаимодействий между удаленными по цепи остатками (тетра- и октапептидные взаимодействия) приблизительно такой же (–19,3 ккал/моль), как и эффекты взаимодействий на всех перекрывающихся ди- (–16,3 ккал/моль) и трипептидных (–21,5 ккал/моль) участках. Значительная стабилизирующая роль принадлежит остаткам Leu⁶ и Glu⁷. В компактной глобальной конформации нонапептида состояния основных и боковых цепей остатков в условиях ограниченной свободы отвечают своим наиболее предпочтительным состояниям у соответствующих коротких фрагментов, где они обладают значительно большей конформационной свободой.

Уделим теперь внимание конформации B₁₂₂₁₂¹–B²–B₁₁³–B₂₁⁴–B₂⁵–B₃₂₁⁶–B₂₂₁⁷–B⁸–B⁹ ($U_{\text{общ}} = 17,3$ ккал/моль), являющейся наиболее выгодной среди структур с полностью развернутым шейпом основной цепи e_8 (см. рис. IV.6). Она не отличается от глобальной структуры ($U_{\text{общ}} =$

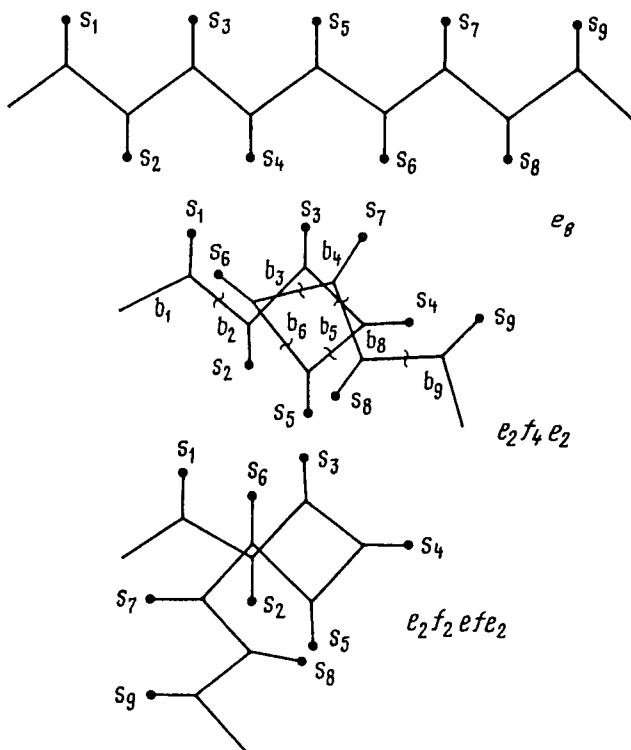


Энергетическое распределение конформаций фрагмента
Arg¹–Pro²–Asp³–Phe⁴–Cys⁵–Leu⁶–Glu⁷–Pro⁸–Pro⁹

Шейп основной цепи	Интервал $U_{\text{общ}}$, ккал/моль						
	>10	10–5	5–4	4–3	3–2	2–1	1–0
e_8	10	–	–	–	–	–	–
e_5fe_2	12	–	–	–	–	–	–
e_4fe_3	6	–	–	–	–	–	–
$e_4f_2e_2$	7	–	–	–	–	–	–
e_3fe_4	11	–	–	–	–	–	–
e_3fefe_2	12	–	–	–	–	–	–
$e_3f_2e_3$	17	–	–	–	–	–	–
$e_3f_3e_2$	12	–	–	–	–	–	–
e_2fe_5	5	–	–	–	–	–	–
$e_2fe_2fe_2$	13	–	–	–	–	–	–
e_2fefe_3	6	–	–	–	–	–	–
$e_2fef_2e_2$	6	–	–	–	–	–	–
$e_2f_2e_4$	19	3	–	–	–	–	–
$e_2f_2efef_2$	24	–	–	–	–	–	–
$e_2f_3e_3$	28	–	–	–	–	–	–
$e_2f_4e_2$	24	2	1	–	–	1	1
efe_6	10	–	–	–	–	–	–
efe_3fe_2	9	1	–	–	–	–	–
efe_2fe_3	12	–	–	–	–	–	–
$efe_2f_2e_2$	7	–	–	–	–	–	–
$efefef_4$	6	1	–	–	–	–	–
$efefefef_2$	10	1	–	–	–	–	–
$efef_2e_3$	9	1	–	–	–	–	–
$efef_3e_2$	12	–	–	–	–	–	–

= 0 ккал/моль) по энергии ди- (–16,2 ккал/моль) и трипептидных (–20,9 ккал/моль) взаимодействий. Большая относительная энергия этой конформации обусловлена не ее напряженностью, а незначительностью взаимодействий между удаленными остатками; суммарный эффект тетра-, пента- и т.д. пептидных взаимодействий составляет всего –1,4 ккал/моль, т.е. на 17,9 ккал/моль меньше, чем у глобальной структуры. Приблизительно на столько же отличаются у них величины $U_{\text{общ}}$. Отсюда можно заключить, что основной особенностью глобальной конформации является реализация значительных стабилизирующих взаимодействий между всеми остатками нонапептида Arg¹–Pro⁹. В данном случае эта структура была сравнена с полностью развернутой, где заведомо отсутствуют контакты между удаленными остатками. Данный пример иллюстрирует лишь наличие у глобальной конформации согласованности между всеми взаимодействиями.

Рассмотрим свернутую конформацию $B_{2212}^1 - B^2 - B_{31}^3 - B_{11}^4 - B^5 -$

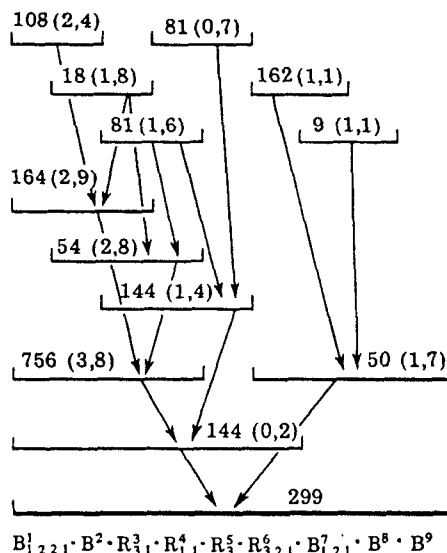


Р и с. IV.6. Шейпы основной цепи фрагмента Arg¹–Pro⁹ молекулы БПТИ

–R₃₂₁⁶–B₃₃₁⁷–B⁸–B⁹ ($U_{\text{общ}} = 13,9$ ккал/моль), имеющую шейп $e_2f_2efe_2$ (см. рис. IV.6). Эффективными здесь являются взаимодействия Leu⁶ с Arg¹ и Asp³ (–4,2 ккал/моль) и Glu⁷ с Arg¹ (–6,8 ккал/моль). Общий энергетический эффект тетра-, пента- и т.д. пептидных взаимодействий равен –10,6 ккал/моль, т.е. на 8,7 ккал/моль меньше, чем у конформации с $U_{\text{общ}} = 0$ ккал/моль. Сближенные в шейпе $e_2f_2efe_2$ остатки Cys⁵ и Pro⁸ стабилизирующих контактов между собой не образуют. Энергия ди- и трипептидных взаимодействий здесь на 3,6 ккал/моль выше, чем у глобальной структуры. Следовательно, эффективные взаимодействия между удаленными остатками у лучшей конформации шейпа $e_2f_2efe_2$ приводят к ослаблению ди- и трипептидных контактов по сравнению с соответствующими состояниями свободных участков Arg¹–Leu⁶ и Leu⁶–Pro⁹. В той или иной степени аналогичная ситуация наблюдается у конформаций всех свернутых шейпов, за исключением $e_2f_4e_2$. В двух случаях ($efe_2f_2e_2$ и $efef_2e_2$) образование стабильных конформаций nonapeптида невозможно из-за стерических напряжений.

На рис. IV.7 показан путь расчета конформационных возможностей nonapeптида Arg¹–Pro⁹. Из рисунка видно, что конформационные состоя-

Arg¹·Pro²·Asp³·Phe⁴·Cys⁵·Leu⁶·Glu⁷·Pro⁸·Pro⁹



Р и с. IV.7. Схема расчета конформаций Arg¹–Pro⁹ молекулы БПТИ

Приведены количества рассчитанных вариантов и величины относительной энергии (в скобках) конформационных состояний свободных фрагментов, вошедших в глобальную структуру ионапептида

ния отдельных участков в глобальной структуре отвечают низкоэнергетическим конформациям свободных фрагментов. Максимальный разброс составляет 0–3,8 ккал/моль, причем большие величины $U_{\text{общ}}$ имеют короткие фрагменты, включающие Arg¹, в пределах которых не может быть в полной мере реализована потенция этого остатка к взаимодействиям. Однако среди конфор-

маций, имеющих ту же форму основной цепи, они наиболее предпочтительны. Таким образом, величина $U_{\text{общ}}$ какой-либо конформации короткого участка белковой цепи не является удовлетворительным критерием для оценки вероятности реализации конформации в белке. Более показательным представляется отношение энергии данной конформации к энергии других вариантов, имеющих сходную форму основной цепи или шейпа. Поэтому при фрагментарном конформационном анализе белка на более поздних стадиях расчета из-за неполной реализации средних взаимодействий на коротких участках следует учитывать возможно большее число различных конформеров, отвечающих коротким участкам основной цепи. В данном случае величины $U_{\text{общ}}$ конформационных состояний фрагментов, составивших глобальную структуру, попадают в начало или в середину энергетических интервалов, которые были приняты для отбора перспективных вариантов.

В табл. IV.4 приведены теоретические значения двугранных углов ϕ , ψ , ω и χ в глобальной конформации свободного нонапептида Arg¹–Pro⁹ и экспериментальные значения этих углов, полученные с помощью рентгеноструктурного анализа. Сравнение теоретической и экспериментальной кристаллической структуры указывает на их полное совпадение по шейпу и форме основной цепи. Более того, имеется удовлетворительное количественное соответствие между теоретическими и опытными значениями подавляющего большинства конформационных параметров; расхождение, как правило, не выходит за общепринятые границы экспериментальных ошибок при рентгеноструктурном анализе белков. Трудно предположить, что совпадение случайно. Из более чем 10^7 возможных конформационных вариантов нонапептида (произведение исходных низкоэнергетических конформаций всех монопептидов) на завершающем этапе

Экспериментальные* и теоретические значения конформационных параметров
(град) фрагмента Arg¹-Pro⁹ молекулы БПТИ

Остаток	Основная цепь			Боковая цепь			
	φ	ψ	ω	χ ₁	χ ₂	χ ₃	χ ₄
Arg ¹	—	144	179	82	-179	56	82
	60	146	170	61	175	180	74
Pro ²	-58	152	177	-174	177	-170	
	-60	143	170	180	180	180	
Asp ³	-61	-30	-177	-86	5		
	-94	-40	-173	-61	30		
Phe ⁴	-74	-12	169	66	71		
	-68	-29	173	63	83		
Cys ⁵	-65	-17	176	-56			
	-61	-36	-172	-59			
Leu ⁶	-92	-5	175	-54	-174	—	—
	-88	-67	-173	-52	177	66	62
Glu ⁷	-75	147	175	17	177	73	
	-129	149	173	30	178	90	
Pro ⁸	-76	157	178	-178	-165	162	
	-60	159	176	180	180	180	
Pro ⁹	-64	145	-173	178	-175	157	
	-60	149	-179	180	180	180	

*Приведены в верхних строчках параметров для каждого остатка.

рассчитано лишь 299 (всего около 1850) (см. рис. IV.7). Таким образом, была рассмотрена чрезвычайно малая часть, поначалу казалось бы, равновероятных ситуаций. Структура нонапептидного фрагмента, реализующаяся в белке, не только вошла в состав рассчитанных конформаций, но и оказалась среди них термодинамически самой устойчивой. Отметим, что этот факт явился первым серьезным доводом в пользу конформационной теории белка, на основе которой выполнялся расчет БПТИ.

Оставленные для последующего конформационного анализа пять низкоэнергетических структур с В- и R-состояниями Pro⁹ имеют энергию в интервале 0–7,5 ккал/моль (табл. IV.5).

Фрагмент Arg¹-Cys¹⁴. Конформационный анализ тетрадекапептидного участка БПТИ включает предварительный расчет пентапептида Tyr¹⁰-Cys¹⁴ и октапептида Gly⁷-Cys¹⁴, а затем с использованием данных по нонапептиду Arg¹-Pro⁹ – последовательности Arg¹-Cys¹⁴ (рис. IV.8). Расчет фрагмента Tyr¹⁰-Cys¹⁴ выполнен, исходя из предпочтительных конформаций перекрывающихся дипептидных участков, которые были получены из анализа всех возможных комбинаций конформационных состояний соответствующих молекул метиламидов N-ацетил-α-аминокислот. Сочета-

Конформации фрагмента Arg¹-Pro²-Asp³-Phe⁴-Cys⁵-Leu⁶-Glu⁷-Pro⁸-Pro⁹,
отобранные для последующего анализа

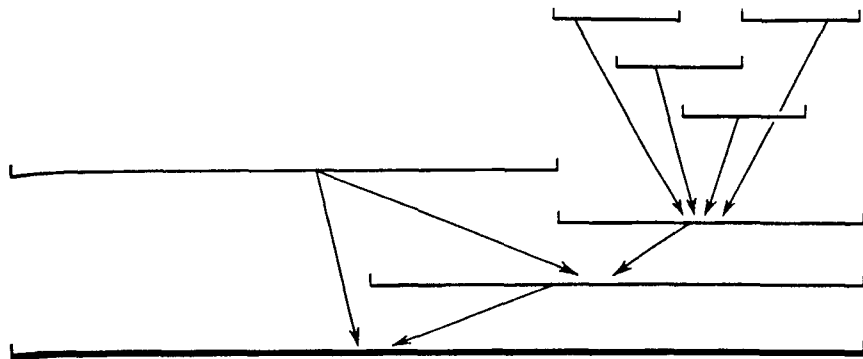
Шейп	Конформация	Энергия $U_{\text{общ}}$ ккал/моль
$e_2f_4e_2$	$\left\{ \begin{array}{l} B_{1221}^1 - B^2 - R_{31}^3 - R_{11}^4 - R_1^5 - R_{32}^6 - B_{121}^7 - B^8 - B^9 (R^9) \\ B_{2211}^1 - B^2 - R_{31}^3 - R_{11}^4 - R_1^5 - R_{32}^6 - B_{121}^7 - B^8 - B^9 (R^9) \end{array} \right.$	0 2,0
$efef_2e_3$	$B_{2212}^1 - R^2 - B_{31}^3 - R_{31}^4 - R_3^5 - B_{32}^6 - B_{221}^7 - B^8 - B^9 (R^9)$	5,4
$e_2f_2e_4$	$B_{1221}^1 - B^2 - R_{31}^3 - R_{11}^4 - B_3^5 - B_{31}^6 - B_{331}^7 - B^8 - B^9 (R^9)$	6,1
$efefef_2$	$B_{2212}^1 - R^2 - B_{31}^3 - R_{31}^4 - B_3^5 - R_{32}^6 - B_{311}^7 - B^8 - B^9 (R^9)$	7,5

ния отобранных низкоэнергетических дипептидных конформаций составили 288 начальных приближений участка Tyr¹⁰-Cys¹⁴. Они распадаются на 16 шейпов, каждый из которых включает 18 конформаций с двумя различными формами основной цепи. Среди большого числа возможных вариантов выделяется ограниченный набор низкоэнергетических состояний фрагмента. Всего 8 конформаций шейпов e_2f_2 , fef_2 и f_4 имеют относительную энергию < 5 ккал/моль.

Конформации шейпа e_2f_2 характеризуются двумя поворотами пептидной цепи, что приводит к изменению ее направления на противоположное, сближая тем самым концы фрагмента, а при соответствующих конформационных состояниях остатков – к образованию эффективных взаимодействий. В лучшей конформации этого шейпа $B_{112}^{10} - R_{12}^{11} - H^{12} - R^{13} - B^{14}$ дополнительная стабилизация за счет тетра- и пентапептидных взаимодействий составляет –5,9 ккал/моль. Различие между конформациями пептидной цепи шейпов fef_2 и e_2f_2 касается только положения остатка Tyr¹⁰ относительно свернутого одинаковым образом участка Thr¹¹-Cys¹⁴. Лучшая конформация шейпа fef_2 $R_{112}^{10} - R_{12}^{11} - H^{12} - R^{13} - B^{14}$ изоэнергетична конформации $B_{112}^{10} - R_{12}^{11} - H^{12} - R^{13} - B^{14}$ шейпа e_2f_2 . Полностью свернутые конформации шейпа f_4 образуются при двух формах основной цепи: $R^{10} - R^{11} - H^{12} - R^{13} - B^{14}$ и $R^{10} - B^{11} - H^{12} - R^{13} - B^{14}$. Все варианты с α -спиральной формой высокоэнергетичны из-за отсутствия значительных стабилизирующих взаимодействий, а не вследствие напряжений, вызываемых Pro¹³. Для дальнейшего анализа отобраны 13 конформаций шейпов e_2f , e_2f_2 , fef_2 , f_2ef и f_4 , энергия которых не превышает 6,0 ккал/моль.

Исходные приближения для минимизации энергии октапептида Glu⁷-Cys¹⁴ сформированы из самого предпочтительного конформационного состояния $B_{121}^7 - B^8 - B^9 (R^9)$ участка Glu⁷-Pro⁸-Pro⁹ и отмеченных 13 состояний участка Tyr¹⁰-Cys¹⁴. Полученные после минимизации при варьировании углов ϕ , ψ , ω и χ величины относительной энергии различных конформаций октапептида приведены в табл. IV.6. Конформации шейпа

Arg¹—Pro²—Asp³—Phe⁴—Cys⁵—Leu⁶—Glu⁷—Pro⁸—Pro⁹—Tyr¹⁰—Thr¹¹—Gly¹²—Pro¹³—Cys¹⁴



Р и с. IV.8. Схема расчета конформаций фрагмента Arg¹—Cys¹⁴ молекулы БПТИ

e_{sf_2} имеют три формы основной цепи, одна из которых представлена пятью вариантами, а две другие — одним. В конформациях всех форм этого типа дополнительные взаимодействия осуществляются в районе стыковки фрагментов Glu⁷—Pro⁹ и Tyr¹⁰—Cys¹⁴ на уровне ди- и трипептидов. Близкая ситуация наблюдается у конформаций типа $e_2fe_2f_2$, которые отличаются от e_{sf_2} изгибом на участке Pro⁹—Tyr¹⁰. Благодаря возникновению незначительных тетра- и пентапептидных контактов энергия некоторых конформаций этого шейпа на 1,0–2,0 ккал/моль ниже соответствующих конформаций e_{sf_2} . В ряде случаев образование новых стабилизирующих взаимодействий сопровождается ослаблением взаимодействий внутри фрагментов Glu⁷—Pro⁹ и Tyr¹⁰—Cys¹⁴. Некоторые конформации пентапептида с формой основной цепи R—R—H—R—B(fe_2) представляют собой компактные структуры и имеют низкую энергию. При их включении в конформации октапептида шейпа $e_3fe_2f_2$ возникают дополнительные контакты между остатками Pro⁹ и Gly¹² (~–2,0 ккал/моль). Однако это приводит к дестабилизации фрагмента Tyr¹⁰—Cys¹⁴ и увеличению энергии приблизительно на 5,0 ккал/моль, что указывает на некомплементарность состояний типа e_2 у трипептида и fe_2 у пентапептида, соединенных между собой цепью B⁹—R¹⁰ (e). При состыковке фрагментов, находящихся в тех же конформационных состояниях, с помощью свернутой цепи R⁹—R¹⁰ (f), т.е. в случае конформации октапептида шейпа $e_2f_2fe_2f_2$, возникают сильные стерические препятствия, и эти конформации становятся нереальными. Шейп e_3f_2ef представлен одной конформацией, в которой сближены почти все остатки; суммарная энергия дополнительных тетра-, пента- и гексапептидных взаимодействий составляет –5,0 ккал/моль. Тем не менее такие контакты неэффективны, так как их образование сопровождается ухудшением взаимодействий во фрагментах Glu⁷—Pro⁹ и Tyr¹⁰—Cys¹⁴. Конформация e_3f_2ef уступает глобальной структуре 6,5 ккал/моль. Конформация близкого шейпа e_2f_3ef вообще нестабильна из-за перекрытия ван-дер-ваальсовых радиусов атомов.

**Относительная энергия конформаций фрагмента Glu⁷-Cys¹⁴
молекулы БПТИ**

Шейп	Конформация	$U_{\text{общ}}$ ккал/ моль
$e_5 f_2$	$B_{121}^7 - B^8 - B^9 - B_{112}^{10} - R_{12}^{11} - H^{12} - R^{13} - B_3^{14*}$	1,7
	$B_{121} - B - B - B_{212} - R_{12} - H - R - B_3^*$	1,3
	$B_{121} - B - B - B_{212} - R_{22} - H - R - B_3$	4,2
	$B_{121} - B - B - B_{212} - R_{32} - H - R - B_3^*$	2,7
	$B_{121} - B - B - B_{312} - R_{12} - H - R - B_3^*$	1,5
	$B_{121} - B - B - B_{212} - R_{12} - R - R - B_3$	6,7
$e_2 f e_2 f_2$	$B_{121} - B - R - B_{212} - R_{12} - H - R - B_3^*$	2,3
	$B_{121} - B - R - B_{212} - R_{12} - H - R - B_3^*$	0
	$B_{121} - B - R - B_{212} - R_{22} - H - R - B_3$	4,7
	$B_{121} - B - R - B_{212} - R_{32} - H - R - B_3^*$	0,2
	$B_{121} - B - R - B_{312} - B_{12} - R - R - B_3^*$	3,4
	$B_{121} - B - R - B_{212} - B_{12} - R - R - B_3$	4,6
$e_6 f$	$B_{121} - B - B - B_{212} - R_{32} - L - R - B_3$	6,4
$e_3 f e f_2$	$B_{121} - B - B - R_{112} - R_{12} - H - R - B_3^*$	3,4
	$B_{121} - B - B - R_{112} - R_{32} - H - R - B_3$	4,2
	$B_{121} - B - B - R_{212} - R_{12} - H - R - B_3^*$	3,3
	$B_{121} - B - B - R_{312} - R_{12} - H - R - B_3^*$	2,7
$e_3 f_2 e f$	$B_{121} - B - B - R_{212} - R_{12} - B - R - B_3$	6,5
$e_3 f_4$	$B_{121} - B - B - R_{212} - B_{32} - H - R - B_3^*$	3,0
$e_2 f_5$	$B_{121} - B - R - R_{212} - B_{32} - H - R - B_3^*$	0,3

*Конформации, отобранные для последующего анализа.

Среди возможных конформеров пентапептида Tyr¹⁰-Cys¹⁴ с полностью свернутой формой шейпа f_4 лишь один вариант с основной цепью $R^{10}-B^{11}-H^{12}-R^{13}-B^{14}$ имеет низкую энергию. В конформации октапептида шейпа $e_3 f_4$ фрагменты Glu⁷-Pro⁹ с развернутой формой цепи и Tyr¹⁰-Cys¹⁴ со свернутой формой остаются в значительной степени автономными, возникает только одно новое взаимодействие между Pro⁹ и Pro¹³ (-1,2 ккал/моль). Ситуация заметно меняется, когда фрагмент Pro⁹-Tyr¹⁰ становится свернутым, т.е. при переходе к конформации $e_2 f_5$. Фрагменты сближаются, и появляются стабилизирующие контакты между Pro⁸ и Thr¹¹ (-2,3 ккал/моль), Pro⁹ и Pro¹³ (-0,8 ккал/моль) и Glu⁷ и Pro¹³ (-2,1 ккал/моль). Однако и в этом случае между новыми и ранее

Энергетическое распределение конформаций фрагмента
Arg¹-Pro²-Asp³-Phe⁴-Cys⁵-Leu⁶-Glu⁷-Pro⁸-Pro⁹-Tyr¹⁰-Thr¹¹-Gly¹²-Pro¹³-Cys¹⁴

Шейп основной цепи	Интервал $U_{\text{общ.}}$ ккал/моль								
	>8	8-7	7-6	6-5	5-4	4-3	3-2	2-1	1-0
$e_2f_4e_5f_2$	4	-	-	1	-	2	1	-	-
$e_2f_4e_2fe_2f_2$	-	2	1	-	1	-	2	1	1
$e_2f_4e_3fef_2$	3	-	1	2	-	-	-	-	-
$e_2f_4e_3f_4$	1	1	-	-	-	-	-	-	-
$e_2f_4e_2f_5$	-	-	1	-	1	-	-	-	-
$e_2f_4e_2fe_3f$	2	-	-	-	-	-	-	-	-
$e_2f_2e_7f_2$	4	-	-	-	-	-	-	-	-
$e_2f_2e_4fe_2f_2$	2	2	-	-	-	-	-	-	-
$e_2f_2e_5fef_2$	3	-	-	-	-	-	-	-	-
$e_2f_2e_5f_4$	1	-	-	-	-	-	-	-	-
$e_2f_2e_4f_5$	-	1	-	-	-	-	-	-	-
$e_2f_2e_4fe_3f$	1	-	-	-	-	-	-	-	-
$efefefef_5f_2$	4	-	-	-	-	-	-	-	-
$efefefef_2fe_2f_2$	4	-	-	-	-	-	-	-	-
$efefefef_3fef_2$	3	-	-	-	-	-	-	-	-
$efefefef_3f_4$	1	-	-	-	-	-	-	-	-
$efefefef_2f_5$	1	-	-	-	-	-	-	-	-
$efefefef_2fe_3f$	1	-	-	-	-	-	-	-	-
$efef_2e_6f_2$	4	-	-	-	-	-	-	-	-
$efef_2e_3fe_2f_2$	3	1	-	-	-	-	-	-	-
$efef_2e_4fe_2f_2$	3	-	-	-	-	-	-	-	-
$efef_2e_4f_4$	1	-	-	-	-	-	-	-	-
$efef_2e_3f_5$	-	1	-	-	-	-	-	-	-
$efef_2e_3fe_3f$	1	-	-	-	-	-	-	-	-

существовавшими у свободных три- и пентапептидных фрагментов взаимодействиями нет удовлетворенной согласованности – появление новых сопровождается ослаблением других. Тем не менее энергия единственной конформации шейпа e_2f_5 остается одной из самых минимальных. Таким образом, проведенный анализ октапептида Glu⁷-Cys¹⁴ не обнаружил конформаций, содержащих такие контакты между фрагментами Glu⁷-Pro⁹ и Tyr¹⁰-Cys¹⁴, которые привели бы к значительному понижению общей энергии. Лучшими вариантами у Glu⁷-Cys¹⁴ оказались те, в которых при минимальных контактах между Glu⁷-Pro⁹ и Tyr¹⁰-Cys¹⁴ фрагменты имеют структуры, отвечающие наиболее предпочтительным структурам при свободном состоянии этих фрагментов. К ним, прежде всего, относятся конформации шейпов ef_2f_2 и $e_2fe_2f_2$ с формами основной цепи В⁷-В⁸-В⁹-В¹⁰-R¹¹-H¹²-B¹³-B¹⁴ и В⁷-В⁸-R⁹-B¹⁰-R¹¹-H¹²-R¹³-B¹⁴.

Начальные конформационные варианты тетрадекапептида Arg¹-Cys¹⁴

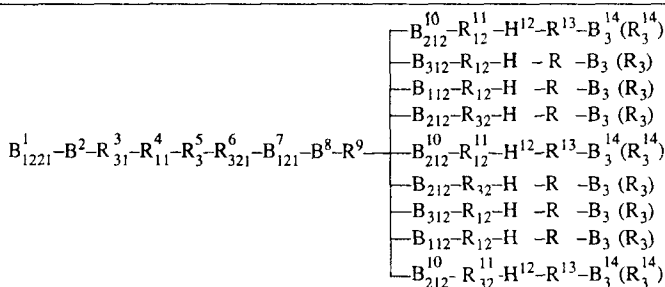
были составлены из предпочтительных состояний фрагментов $\text{Arg}^1\text{-Pro}^9$ и $\text{Glu}^7\text{-Cys}^{14}$ (см. табл. IV.4–IV.6). Задача свелась к рассмотрению 70 конформаций 24 шейпов. Энергетическое распределение оптимальных конформаций тетрадекапептида $\text{Arg}^1\text{-Cys}^{14}$ (табл. IV.7) свидетельствует, что только варианты шейпов $e_2f_4e_3f_2$ и $e_2f_4e_2fe_2f_2$ имеют низкую энергию и перспективны для дальнейшего рассмотрения. К ним также можно отнести одну конформацию шейпа $e_2f_4e_2f_5$. У первых двух шейпов наиболее предпочтительны те варианты, в которых остаток Arg^1 находится в состоянии B_{1212}^1 . Следовательно, у всех низкоэнергетических конформаций обоих шейпов N-концевой фрагмент ($\text{Arg}^1\text{-Pro}^8$) тетрадекапептида находится в одном и том же конформационном состоянии $B_{1221}^1\text{-B}^2\text{-R}_{31}^3\text{-R}_{11}^4\text{-R}_3^5\text{-R}_{32}^6\text{-B}_{121}^7\text{-B}^8$, а фрагмент $\text{Tyr}^{10}\text{-Cys}^{14}$ – в состоянии $B^{10}\text{-R}^{11}\text{-H}^{12}\text{-R}^{13}\text{-B}^{14}$, причем в двух случаях наборы конформационных состояний боковых цепей Tyr^{10} и Thr^{11} одинаковы.

Восемь низкоэнергетических конформаций шейпов $e_2f_4e_3f_2$ и $e_2f_4e_2fe_2f_2$ представляют собой комбинации самых выгодных состояний свободных нонапептида $\text{Arg}^1\text{-Pro}^9$ и пентапептида $\text{Tyr}^{10}\text{-Cys}^{14}$, к наиболее предпочтительным относятся также состояния октапептида $\text{Glu}^7\text{-Cys}^{14}$, приведенные в табл. IV.6. В конформациях шейпа $e_2f_4e_3f_2$ противоположные свернутые концы пептидной цепи удалены друг от друга (рис. IV.9). В более компактных конформациях $e_2f_4e_2fe_2f_2$ сближенными оказываются остатки Pro^2 , Cys^5 и Pro^8 с остатками Tyr^{10} и Cys^{14} . Однако из-за специфики боковых цепей этих остатков и их взаимного расположения эффективных невалентных взаимодействий здесь не возникает. Энергия конформаций подобного типа также складывается практически аддитивно из вкладов свободных фрагментов $\text{Arg}^1\text{-Pro}^9$ и $\text{Tyr}^{10}\text{-Cys}^{14}$. Конформации обоих шейпов различаются только состоянием (B или R) остатка Pro^9 . Из-за отсутствия дальних взаимодействий изменение одного угла ψ_9 приблизительно на 180° не сопряжено со значительными энергетическими затратами.

Найденные низкоэнергетические структуры двух шейпов тетрадекапептида представляют интерес потому, что в случае шейпа $e_2f_4e_3f_2$ форма основной цепи полностью совпадает с конформацией фрагмента $\text{Arg}^1\text{-Cys}^{14}$ в кристаллической структуре БПТИ. Более того, у самой выгодной конформации этого типа рассчитанные значения двугранных углов ϕ , ψ , ω и χ совпадают с экспериментальными. Вторая группа низкоэнергетических конформаций шейпа $e_2f_4e_2fe_2f_2$ может реализоваться при свертывании белковой цепи в условиях *in vitro* в процессе ренатурации восстановленной молекулы БПТИ. Т. Крейтон [7] при исследовании промежуточных состояний, образующихся при свертывании денатурированной белковой цепи, обнаружил продукт с дисульфидной связью между Cys^5 и Cys^{14} , которая отсутствует в нативной структуре БПТИ. В свете полученных результатов образование такой связи весьма вероятно. Расчет показал, что в самых предпочтительных по энергии конформациях $e_2f_4e_2fe_2f_2$ свободного тетрадекапептида $\text{Arg}^1\text{-Cys}^{14}$ остатки Cys^5 и Cys^{14} оказываются сближенными (см. рис. IV.9). Таким образом, из найденных теоретически низкоэнергетических конформаций двух форм основной цепи

Низкоэнергетические конформации фрагмента Arg¹-Cys¹⁴ молекулы БПТИ

Конформация



дования силового поля конформации фрагмента Arg¹-Cys¹⁴, совпадающей с экспериментом ($U_{\text{общ}} = 2,8$ ккал/моль) (см. табл. IV.8 и рис. IV.9), получен ряд сечений ϕ - ψ потенциальной поверхности. Для их построения определялась энергия во всех точках той низкоэнергетической области конформационной карты ϕ - ψ монопептида, в которую попадают значения двугранных углов соответствующего остатка в исследуемой конформации Arg¹-Cys¹⁴. Положение боковой цепи этого остатка и конформационные состояния других остатков фрагмента в данном случае остаются неизменными. Сечения были построены для Asp³, Phe⁴, Cys⁵, Leu⁶, Glu⁷, Pro⁸, Pro⁹, Gly¹² и Pro¹³. На конформационных картах ϕ - ψ остатков Asp³, Phe⁴, Cys⁵ и Leu⁶ с R-формой основной цепи обнаруживается лишь один энергетический минимум. На рис. IV.10, а потенциальные минимумы остатков Asp³, Phe⁴, Cys⁵ и Leu⁶ совмещены с областью R конформационной карты метиламида N-ацетилаланина. На карте ϕ - ψ свободного монопептида они занимают небольшую площадь в средней части области R, имеющей самую низкую энергию. Найденные для оптимальной конформации фрагмента Arg¹-Cys¹⁴ ($U_{\text{общ}} = 2,8$ ккал/моль) значения ϕ , ψ точно отвечают самым низкоэнергетическим точкам соответствующих минимумов.

Таким образом, остатки Asp³, Phe⁴, Cys⁵ и Leu⁶ в кристаллической структуре фрагмента обладают ограниченной конформационной свободой и находятся в наиболее низкоэнергетических состояниях. Поскольку в каждом случае имеется только одна область низкой энергии, конформационное состояние каждого остатка пептидной цепи фрагмента Arg¹-Cys¹⁴ взаимообусловлено. Кооперативность столь велика, что делает невозможным изменение конформации основной цепи одного остатка без одновременного изменения конформаций других остатков, т.е. без разрушения всей системы средних взаимодействий, в данном конформационном состоянии. В силу этого обстоятельства, а тем более при наличии согласованности ближних, средних и дальних взаимодействий маловероятно не только изменение структуры основной цепи данного участка, но и большие отклонения углов ϕ , ψ в рамках той же структуры при генерации аминокислотной последовательности и ее укладке в нативную структуру

Конформационная энергия, ккал/моль

$U_{\text{общ}}$	$U_{\text{вдв}}$	$U_{\text{торс}}$	$U_{\text{ис}}$	$U_{\text{эл}}$
2,8	-60,8	6,1	-6,0	-0,7
3,7	-60,2	6,5	-6,0	-0,8
3,8	-60,8	7,2	-6,0	-0,8
5,4	-58,4	6,3	-6,0	-0,7
0	-65,0	7,9	-6,0	-1,1
1,3	-64,1	8,3	-6,0	-1,1
2,4	-62,6	8,1	-6,0	-1,3
2,5	-62,5	8,3	-6,0	-1,5
4,5	-62,9	10,7	-6,4	-1,1

БПТИ. Именно в этом одна из причин удовлетворительного совпадения рассчитанных для свободного фрагмента конформационных параметров с параметрами в сложившейся структуре белка. Простой профиль потенциальных сечений объясняет эффективность процедуры минимизации. Сказанное относится и к остатку Glu⁷ с В-формой основной цепи. Его сечение ϕ - ψ (см. рис. IV.10, б) также содержит одну область низкой энергии, вытянутую вдоль оси ϕ ; ее минимум отвечает расчетным углам ϕ , ψ остатка Glu⁷ в рассмотренной конформации Arg¹-Cys¹⁴. Сечение потенциальной поверхности ϕ - ψ остатка Gly¹² (см. рис. IV.10, в) имеет две области низкой энергии, которые занимают большую по сравнению с рассмотренными случаями площадь. Несмотря на удовлетворительное совпадение уже полученных результатов расчета с опытными данными, необходимо выяснить причину наличия в одной низкоэнергетической области нескольких потенциальных ям, так как в ином случае последующий конформационный анализ белка может пойти по неправильному руслу.

В самом деле, расчет Arg¹-Cys¹⁴ привел к набору низкоэнергетических конформаций, на основе которых будет проводиться дальнейшее исследование БПТИ. В этом наборе все варианты содержат остаток Gly¹² в более предпочтительном для свободного фрагмента состоянии с $\phi = 126^\circ$ и $\psi = -84^\circ$. С помощью используемой процедуры минимизации невозможно прийти к иному состоянию, отвечающему второй потенциальной яме. Для этого нужно задать соответствующее нулевое приближение, что требует знания потенциальной поверхности. Пример с Gly¹² показывает, что исследование у наиболее предпочтительных конформаций сечений потенциальной поверхности должно явиться составной частью априорного расчета трехмерной структуры белка. Таким образом, структурное исследование Arg¹-Cys¹⁴-участка БПТИ выявило девять низкоэнергетических и в принципе перспективных для последующего анализа конформаций, принадлежащих шейпам $e_1f_4e_2f_2$, $e_2f_4e_2f_2$ и $e_2f_4e_2f_3$ (табл. IV.8).

Фрагмент Arg¹-Tyr²¹. Схема расчета фрагмента Arg¹-Tyr²¹ приведена на рис. IV.11. Сложность задачи потребовала разделить анализ этого фрагмента на большое число ступеней. Кратко остановимся на одном из промежуточных этапов расчета гептадекапептида Arg¹-Arg¹⁷. Его началь-

Относительная энергия конформаций фрагмента Arg¹-Tyr²¹ молекулы БПТИ

Шейп	Конформация
<i>e₃f₄e₃f₂e₇</i>	B ¹ ₁₂₂₁ -B ² -R ³ ₃₁ -R ⁴ ₁₁ -R ⁵ ₃ -R ⁶ ₃₂ -B ⁷ ₁₂₁ -B ⁸ -B ⁹
<i>e₃f₄e₃f₂e₃f₄</i>	B ₁₂₂₁ -B-R ₃₁ -R ₁₁ -R ₃ -R ₃₂ -B ₁₂₁ -B-B
<i>e₃f₄e₃f₂f₃f₂e₃f</i>	B ₁₂₂₁ -B-R ₃₁ -R ₁₁ -R ₃ -R ₃₂ -B ₁₂₁ -B-B
<i>e₃f₄e₃f₂e₃f₂e₃f₂e</i>	B ₁₂₂₁ -B-R ₃₁ -R ₁₁ -R ₃ -R ₃₂ -B ₁₂₁ -B-B
<i>e₃f₄e₃f₂e₃f₂e₃f₂e₃f</i>	B ₁₂₂₁ -B-R ₃₁ -R ₁₁ -R ₃ -R ₃₂ -B ₁₂₁ -B-B
<i>e₃f₄e₃f₆e₆</i>	B ₁₂₂₁ -B-R ₃₁ -R ₁₁ -R ₃ -R ₃₂ -B ₁₂₁ -B-B
<i>e₃f₄e₃f₆e₃f</i>	B ₁₂₂₁ -B-R ₃₁ -R ₁₁ -R ₃ -R ₃₂ -B ₁₂₁ -B-B
<i>e₃f₄e₃f₆e₃f₄</i>	B ₁₂₂₁ -B-R ₃₁ -R ₁₁ -R ₃ -R ₃₂ -B ₁₂₁ -B-B
<i>e₃f₄e₃f₆e₃f₂e</i>	B ₁₂₂₁ -B-R ₃₁ -R ₁₁ -R ₃ -R ₃₂ -B ₁₂₁ -B-B
<i>e₃f₄e₃f₅e₇</i>	B ₁₂₂₁ -B-R ₃₁ -R ₁₁ -R ₃ -R ₃₂ -B ₁₂₁ -B-B
<i>e₃f₄e₃f₅e₃f</i>	B ₁₂₂₁ -B-R ₃₁ -R ₁₁ -R ₃ -R ₃₂ -B ₁₂₁ -B-B
<i>e₃f₄e₃f₅e₃f₄</i>	B ₁₂₂₁ -B-R ₃₁ -R ₁₁ -R ₃ -R ₃₂ -B ₁₂₁ -B-B
<i>e₃f₄e₃f₅e₃f₂e</i>	B ₁₂₂₁ -B-R ₃₁ -R ₁₁ -R ₃ -R ₃₂ -B ₁₂₁ -B-B

* Конформации, отобранные для дальнейшего анализа.

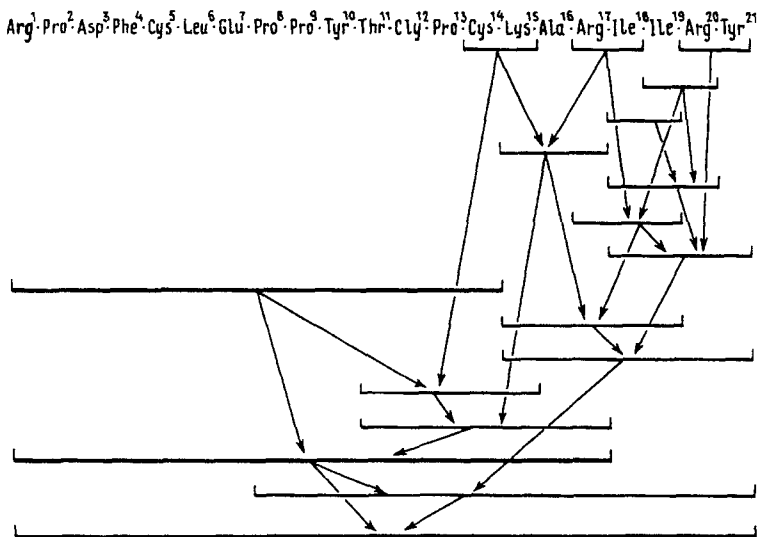
ные приближения были составлены из предпочтительных конформаций, перекрывающихся по четырем остаткам тетрадекапептида Arg¹-Cys¹⁴ и гептапептида Thr¹¹-Arg¹⁷. Они могут быть разбиты на три группы. К первой относятся 24 конформации Arg¹-Arg¹⁷, в которых отобранные четыре варианта фрагмента Arg¹-Cys¹⁴ имеют шейп *e₃f₄e₃f₂* и фрагмента Cys¹⁴-Arg¹⁷ – шейпы *e₃e₂f*, *e₃f₂*, *e₃f₂* и *f₂e₃*, отвечающие состояниям этого тетрапептида в низкоэнергетических конформациях фрагмента Thr¹¹-Arg¹⁷. Варианты второй группы различаются лишь конформацией Pro⁸ и на участке Arg¹-Cys¹⁴ относятся к шейпу *e₃f₄e₃f₂e₃f₂*. Третью группу образуют структуры, имеющие одинаковое конформационное состояние фрагмента Arg¹-Cys¹⁴ шейпа *e₃f₄e₃f₅* и восемь различных состояний участка Cys¹⁴-Arg¹⁷ шейпов *e₃e₂f*, *e₃f₂*, *e₃f₂* и *f₂e₃*. У первой группы имеются четыре низкоэнергетические конформации шейпов *e₃f₄e₃f₂e₃* и *e₃f₄e₃f₂e₃f*. Среди 24 рассчитанных конформаций второй группы лишь две имеют относительно низкую энергию (4,4 и 5,9 ккал/моль). Они принадлежат шейпу *e₃f₄e₃f₂e₃f₂e₃f*. Из восьми рассмотренных структурных вариантов третьей группы шесть имеют энергию от 0 до 5,5 ккал/моль. Таким образом, минимизация 56 исходных вариантов гептадекапептида свидетельствует о резкой энергетической дифференциации его конформаций. Запрещенными из-за многочисленных неблагоприятных контактов между С-концевым и центральными участками фрагмента оказываются 41 конформация. Девять конформаций Arg¹-Arg¹⁷ с $U_{\text{общ}} < 10,0$ ккал/моль явились исходными для анализа более сложного фрагмента молекулы БПТИ.

Следующий за гептадекапептидом Arg¹-Arg¹⁷ участок Ile¹⁸-Ile¹⁹-Arg²⁰-Tyr²¹ содержит объемные и конформационно лабильные остатки. Рассмотрение конформационных возможностей свободных фрагментов Ile¹⁸-Tyr²¹, Lys¹⁵-Ile¹⁹, Lys¹⁵-Tyr²¹, Pro⁸-Tyr²¹ с учетом данных для

Конформация	$U_{\text{общ.}}$ ккал/моль
$-B_{212}^{10}-R_{32}^{11}-H^{12}-R^{13}-B_3^{14}-B_{3122}^{15}-B^{16}-B_{3222}^{17}-B_{32}^{18}-B_{32}^{19}-B_{3322}^{20}-B_{312}^{21*}$	2,1
$-B_{212}-R_{32}-H-R-B_3-B_{3323}-R-B_{2222}-B_{32}-B_{32}-B_{3222}-B_{312}$	8,5
$-B_{212}-R_{32}-H-R-B_3-B_{3323}-R-B_{2222}-B_{22}-B_{32}-R_{3222}-B_{312}$	7,5
$-B_{212}-R_{32}-H-R-B_3-B_{3323}-R-B_{3222}-B_{21}-R_{32}-B_{3322}-B_{212}$	7,9
$-B_{212}-R_{32}-H-R-B_3-B_{3323}-R-B_{3222}-R_{32}-B_{32}-R_{2222}-B_{312}^*$	6,2
$-R_{212}-B_{32}-H-R-R_3-B_{3323}-B-B_{1222}-B_{32}-B_{12}-B_{3322}-B_{312}^*$	0
$-R_{212}-B_{32}-H-R-R_3-B_{3323}-B-B_{2222}-B_{22}-B_{32}-R_{2122}-B_{312}$	8,7
$-R_{212}-B_{32}-H-R-R_3-B_{3323}-R-B_{2222}-B_{32}-B_{32}-B_{3322}-B_{312}$	4,8
$-R_{212}-B_{32}-H-R-R_3-B_{3323}-R-B_{3322}-B_{21}-R_{32}-B_{3322}-B_{212}$	4,3
$-R_{212}-B_{32}-H-R-B_3-B_{3323}-B-B_{1222}-B_{32}-B_{12}-B_{3322}-B_{312}$	7,0
$-R_{212}-B_{32}-H-R-B_3-B_{3323}-B-B_{2222}-B_{22}-B_{32}-R_{2122}-B_{312}$	10,0
$-R_{212}-B_{32}-H-R-R_3-B_{3323}-R-B_{2222}-B_{32}-B_{32}-B_{3322}-B_{312}^*$	4,2
$-R_{212}-B_{32}-H-R-B_3-B_{3323}-R-B_{2222}-B_{22}-B_{32}-R_{3222}-B_{312}$	8,1

Arg¹-Arg¹⁷ позволило оценить взаимоотношение между всеми частями участка Arg¹-Tyr²¹ БПТИ. В результате задача была сведена к нахождению взаимодействий между остатками на противоположных концах фрагмента Arg¹-Tyr²¹. Результаты минимизации фрагмента Arg¹-Tyr²¹ приведены в табл. IV.9. Все найденные низкоэнергетические варианты представляют исключительный интерес. Одна из низкоэнергетических конформаций фрагмента Arg¹-Tyr²¹ ($U_{\text{общ}} = 2,1$ ккал/моль) имеет шейп $e_2f_4e_5f_2e_7$. Начальный участок этой конформации (Arg¹-Pro⁹) представляет собой конформационно жесткое ядро. Далее, благодаря следующим друг за другом остаткам пролина цепь отходит от него, на участке Pro⁸-Thr¹¹ имеет развернутую форму, а на участке, включающем остатки Thr¹¹-Lys¹⁵, делает поворот на 180°. Поворот цепи в этом месте имеется во всех низкоэнергетических конформациях фрагмента Arg¹-Tyr²¹. После поворота на участке Lys¹⁵-Tyr²¹ наиболее выгодной опять становится развернутая форма основной цепи. Ее предпочтительность объясняется двумя причинами. Во-первых, как было выяснено при анализе ряда фрагментов разной длины, такое состояние основной цепи с точки зрения энергии и энтропии является одним из самых предпочтительных как для свободного фрагмента Lys¹⁵-Tyr²¹, так и для составляющих его участков. Во-вторых, при развернутой цепи создаются наиболее благоприятные условия для образования стабилизирующих контактов фрагмента Lys¹⁵-Tyr²¹ с подавляющим большинством остатков предшествующего участка.

Знаменательным фактом является совпадение описанной конформации с геометрией этого участка в трехмерной структуре молекулы БПТИ, найденной с помощью рентгеноструктурного анализа. Совпадение теоретической и кристаллической структур Arg¹-Tyr²¹ касается не только шейки и формы основной цепи, но и численных значений конформационных параметров ϕ , ψ , ω и χ подавляющего большинства остатков. Много общего



Р и с. IV.11. Схема расчета конформаций фрагмента Arg¹–Tyr²¹ молекулы БПТИ

с рассмотренной конформацией имеет структура с $U_{\text{общ}} = 6,2$ ккал/моль (см. табл. IV.9). На участке Arg¹–Tyr²¹ она отличается лишь значением угла ψ_9 , который отвечает R-форме остатка Pro⁹. Далее на участке Pro⁹–Ala¹⁶ цепь образует около двух витков спирали (не α -спирали) и затем вновь, как и в конформации с $U_{\text{общ}} = 2,1$ ккал/моль, приобретает развернутый характер. Таким образом, низкоэнергетические структуры Arg¹–Tyr²¹ состоят из конформационно близких, но по-разному упакованных микроглобул, которые различаются состояниями боковых цепей.

Конформации с величинами $U_{\text{общ}} = 0$ и 6,2 ккал/моль, а также некоторые другие представляют интерес в связи с результатами, полученными Крейтоном [7] при исследовании процесса укладки денатурированной белковой цепи и локализации у метастабильных промежуточных продуктов дисульфидных связей. На разных стадиях окисления восстановленного белка Крейтон обнаружил продукты с S–S-мостиками между Cys⁵ и Cys¹⁴, Cys⁵ и Cys³⁸, Cys⁵ и Cys⁵⁵. В конформации с энергией 6,2 ккал/моль остатки Cys⁵ и Cys¹⁴ оказываются сближенными. Соответствующая конформация у фрагмента Arg¹–Cys¹⁴ была глобальной (см. табл. IV.8), а структура, близкая к экспериментальной, проигрывала ей 2,8 ккал/моль. У свободного фрагмента Arg¹–Arg¹⁷ последняя оказалась уже на 3,1 ккал/моль более предпочтительной, а у фрагмента Arg¹–Tyr²¹ – на 4,1 ккал/моль. Поэтому можно полагать, что метастабильное конформационное состояние молекулы БПТИ с дисульфидным мостиком Cys⁵–Cys¹⁴ характерно для ранней стадии ренатурации белка. Глобальная и близкие ей низкоэнергетические структуры могут при удлинении цепи привести к сближенности остатков Cys⁵ и Cys³⁸, Cys⁵ и Cys⁵⁵. В связи с этим обстоятельством низкоэнергетические структуры разных типов, энергии которых отмечены в табл. IV.9 звездочками, оставлены для дальнейшего анализа.

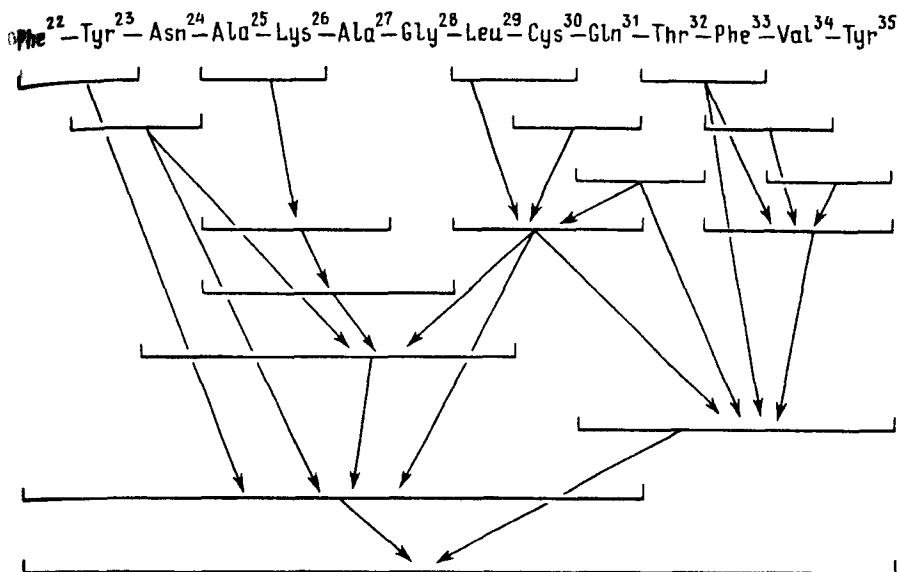


Рис. IV.12. Схема расчета конформаций фрагмента $\text{Phe}^{22} - \text{Tyr}^{35}$ молекулы БПТИ

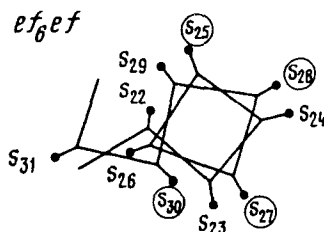
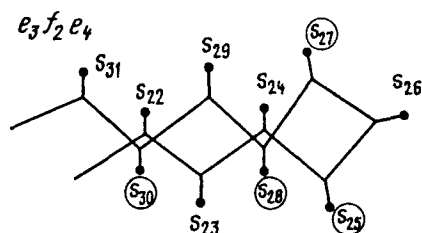


Рис. IV.13. Шейпы основной цепи низкоэнергетических конформаций фрагмента $\text{Phe}^{22} - \text{Gln}^{31}$ молекулы БПТИ

Кружками выделены остатки с малыми боковыми цепями: Gly, Ala, Cys

Фрагмент $\text{Phe}^{22} - \text{Tyr}^{35}$ (схема расчета приведена на рис. IV.12). Не будем останавливаться на анализе конформационных состояний простых участков фрагмента, а начнем рассмотрение сразу с результатов расчета участка $\text{Phe}^{22} - \text{Gln}^{31}$. Основу его нулевых приближений составили низкоэнергетические конформации гексапептида $\text{Asn}^{24} - \text{Leu}^{29}$. Для N-концевого фрагмента $\text{Phe}^{22} - \text{Tyr}^{23}$ выбраны шесть конформационных состояний, имеющих четыре формы основной цепи шейпов e и f , полученные из анализа

**Низкоэнергетические конформации фрагмента Phe²²-Gln³¹
молекулы БПТИ**

Шейп	Конформация	$U_{\text{общ}}$ ккал/моль
$e_3f_2e_4$	$B_{11}^{22}-B_{23}^{23}-B_{23}^{24}-R_{3322}^{25}-R_{3322}^{26}-R_{27}^{27}-L_{28}^{28}-B_{11}^{29}-B_3^{30}-B_{321}^{31}$	0
$efef_5e$	$B_{11}-R_{31}-B_{23}-R-R_{2222}-R-R-R_{32}-B_3-B_{333}$	5,1
f_2ef_5e	$R_{23}-R_{31}-B_{23}-R-R_{2222}-R-R-R_{32}-B_3-B_{333}$	5,3
ef_6ef	$B_{21}-R_{31}-R_{11}-R-R_{2222}-R-R-B_{23}-R_3-B_{213}$	5,5
$e_3f_2e_3f$	$B_{21}-B_{31}-B_{23}-R-R_{1222}-B-B-B_{32}-R_3-B_{333}$	5,7
$efef_4e_2$	$B_{21}-R_{31}-B_{13}-R-R_{2222}-R-R-B_{21}-B_3-B_{333}$	5,8
fe_2f_5e	$R_{21}-B_{31}-B_{23}-R-R_{2222}-R-R-R_{32}-B_3-B_{333}$	6,0
ef_6e_2	$B_{21}-R_{31}-R_{11}-R-R_{3322}-R-R-B_{21}-B_3-B_{333}$	6,4
$efef_4ef$	$B_{21}-R_{31}-B_{13}-R-R_{2222}-R-R-B_{21}-R_3-B_{333}$	7,4
e_3f_5e	$B_{11}-B_{31}-B_{23}-R-R_{2222}-R-R-R_{32}-B_3-B_{333}$	7,9

дипептидных фрагментов Phe²²-Tyr²³ и Tyr²³-Asn²⁴. Нулевые приближения С-концевого участка декапептида представляют четыре самые низкоэнергетические состояния участка Cys³⁰-Gln³¹, полученные при расчете трипептида Leu²⁹-Cys³⁰-Gln³¹. Всего для декапептида были сформированы 408 исходных для минимизации приближений. Они представляют при выбранных 17 конформациях гексапептида Asn²⁴-Leu²⁹ все возможные 112 шейпов и 128 форм основной цепи Phe²²-Gln³¹. Минимизация энергии выявила резкую дифференциацию конформаций декапептидного фрагмента. Из большого числа рассчитанных вариантов с самыми разнообразными формами основной цепи и ориентациями боковых цепей в интервал 0–5,0 ккал/моль попадает лишь одна конформация, а в интервал 0–8,0 ккал/моль – 10 конформаций (табл. IV 10). В чем же причина столь однозначного конформационного детерминирования декапептида Phe²²-Gln³¹?

В глобальной конформации основная цепь на участке Phe²²-Ala²⁵ имеет развернутый характер, затем она делает поворот приблизительно на 180° и на участке Ala²⁷-Gln³¹ вновь становится развернутой. На рис. IV 13 приведены шейп $e_3f_2e_4$ глобальной конформации декапептида и для сравнения шейп ef_6ef конформации с $U_{\text{общ}} = 5,5$ ккал/моль. Основная цепь во второй конформации почти полностью свернута и, на первый взгляд представляется более компактной. Однако для последовательности Phe²²-Gln³¹ α -спираль и свернутые формы других типов оказываются неудовлетворительными, так как они не в состоянии обеспечить образование благоприятных контактов. Из рисунка видно, что в случае шейпа ef_6ef остатки Tyr²³, Asn²⁴ и Leu²⁹, Gln³¹, отделенные друг от друга остатками с малой боковой цепью, находятся по разные стороны спирали и ни при каких положениях боковых цепей не могут взаимодействовать между собой. При конформации основной цепи с $U_{\text{общ}} = 0$ ккал/моль, напротив, имеет место сближенность остатков, особенно важных для невалентных взаимодействий.

Конформационный анализ свободных декапептида Phe²²-Gln³¹ и пентапептида Gln³¹-Tyr³⁵ показал, что у первого фрагмента реальна одна конформация B₁₁²²-B₂₃²³-B₂₃²⁴-R₃₃₂₂²⁵-R₃₃₂₂²⁶-R²⁷-L²⁸-B₁₁²⁹-B₃³⁰-B₃₂₁³¹ шейпа e₃f₂e₄, а у второго – несколько конформаций одной и той же формы основной цепи B₃₁³¹-B₃₂³²-B₃₃³³-B₃₄³⁴-B₃₅³⁵ шейпа e₄. Эти результаты однозначно определяют для тетрадекапептидного участка БПТИ Phe²²-Tyr³⁵ шейп пептидного скелета, форму основной цепи и конформационные состояния большинства остатков. Таким образом, задача анализа фрагмента Phe²²-Tyr³⁵ сводится к установлению наиболее предпочтительных ориентаций боковых цепей Gln³¹, Thr³², Phe³³. Расчет привел к единственной структуре фрагмента: B₁₁²²-B₂₃²³-B₂₃²⁴-R₃₃₂₂²⁵-R₃₃₂₂²⁶-R²⁷-L²⁸-B₁₁²⁹-B₃³⁰-B₃₂₁³¹-B₃₂³²-B₁₁³³-B₂³⁴-B₃₁³⁵ шейпа e₃f₂e₈.

Самым интересным фактом является совпадение найденной априорно для свободного участка Phe²²-Tyr³⁵ конформации с геометрией этого участка в структуре молекулы БПТИ, полученной с помощью рентгеноструктурного анализа. Расхождения между опытными и теоретическими значениями углов φ, ψ, ω и χ не выходят за общепринятые границы экспериментальных ошибок рентгеноструктурного анализа белков высокого разрешения.

Фрагмент Arg¹-Cys³⁸. На завершающем этапе расчета для фрагмента Arg¹-Tyr²¹ были получены семь низкоэнергетических структурных вариантов, оставленных для последующего анализа. В двух самых выгодных конформациях с U_{общ} = 0 и 2,1 ккал/моль (см. табл. IV.9) С-концевой участок Lys¹⁵-Tyr²¹ имеет полностью развернутую форму цепи. Расчет фрагмента Phe²²-Tyr³⁵ показал, что для него реальна лишь одна конформация, которая является частью антипараллельной β-структуры. Ее дальнейшее формирование представляется тем более вероятным, что в самых выгодных конформациях предшествующего фрагмента Arg¹-Tyr²¹ С-концевой участок имеет комплементарную β-структуре развернутую форму основной цепи. В связи с этим перед расчетом фрагмента Arg¹-Cys³⁸ были рассмотрены конформационные возможности фрагментов Cys¹⁴-Tyr³⁵, Tyr³⁵-Gly³⁷ и Cys¹⁴-Cys³⁸. Исходные варианты фрагмента Cys¹⁴-Tyr³⁵ составлены из конформационных состояний октапептида Cys¹⁴-Tyr³⁵, которые он принимает в семи оставленных для дальнейшего анализа низкоэнергетических структурах Arg¹-Tyr²¹ и в одной конформации тетрадекапептида Phe²²-Tyr³⁵. Всего было рассчитано 14 вариантов, так как при включении Cys¹⁴-Tyr²¹ в последовательность Cys¹⁴-Tyr³⁵ снимается энергетическое вырождение R- и B-форм остатка Tyr²¹ и число вариантов увеличивается. Результаты расчета полностью подтвердили сделанное предположение о предрасположенности встраивания остатков Cys¹⁴-Tyr²¹ в β-структуру. В результате минимизации энергии при варьировании двугранных углов основных и боковых цепей фрагментов Cys¹⁴-Phe²² и Ala²⁵-Tyr³⁵ выяснилось, что для фрагмента Cys¹⁴-Tyr³⁵ реальны только два конформационных состояния – именно те, которые на участке Cys¹⁴-Tyr²¹ имеют развернутую форму и входят в самые предпочтительные структуры фрагмента Arg¹-Tyr²¹ (U_{общ} = 0 и 2,1 ккал/моль). Другие структурные варианты, по крайней мере, на 12 ккал/моль менее стабильны.

Рассмотрим результаты анализа фрагмента Tyr³⁵–Gly³⁶–Gly³⁷, завершающего построение β-структуры. Его нулевые приближения составлены из В- и R-форм остатка Tyr³⁵ с $\chi_1 \sim 60, 180$ и -60° и В-, R-, L- и H-форм остатков Gly³⁶ и Gly³⁷. Они имеют 32 формы основной цепи и разбиваются на четыре шейпа (по 24 варианта в каждом). Энергетическое распределение конформаций свидетельствует о большой лабильности фрагмента Tyr³⁵–Gly³⁷. Почти все его конформационные состояния попадают в узкий интервал энергии 0–3,0 ккал/моль и, следовательно, являются вероятными. Поэтому определять конформационные состояния фрагмента Arg¹–Cys³⁸ описанным выше путем нецелесообразно. Выбранный подход состоял в последовательном присоединении к Cys¹⁴–Tyr³⁵ остатков лабильного участка Gly³⁶–Cys³⁸ и выявлении их лучших конформационных состояний. С этой целью вначале строились сечения потенциальной поверхности Ψ_{35} – Φ_{36} при фиксированных значениях остальных углов фрагмента Cys¹⁴–Tyr³⁵, а затем Ψ_{36} – Φ_{37} и Ψ_{37} – Φ_{38} при фиксированных параметрах фрагментов Cys¹⁴–Gly³⁶ и Cys¹⁴–Gly³⁷ соответственно. В области самой низкой энергии выбирались углы, которые фиксировались при следующем шаге. На каждом этапе и после окончания всей процедуры проводили минимизацию энергии при варьировании двугранных углов вначале у вновь присоединенных остатков, а потом всего фрагмента.

В глобальной структуре Cys¹⁴–Tyr³⁵ самой предпочтительной для Tyr³⁵–Cys³⁸ оказалась конформация B₂₁³⁵–R³⁶–H³⁷–B³⁸(R³⁸) с развернутой формой основной цепи. Это неудивительно, поскольку такое состояние стерически наиболее комплементарно участку Cys¹⁴–Ile¹⁸, входящему в противостоящий участок β-структуры. При состыковке фрагмента Tyr³⁵–Cys³⁸ с фрагментом Cys¹⁴–Tyr³⁵, имеющим конформацию с $U_{\text{общ}} = 1,8$ ккал/моль, наиболее выгодной также оказалась развернутая форма основной цепи. Однако в этом случае взаимодействия Tyr³⁵–Cys³⁸ с предшествующими остатками менее эффективны, и разница в энергии двух возможных конформационных вариантов фрагмента Cys¹⁴–Cys³⁸ увеличилась до 3,0 ккал/моль. Кроме того, структура Cys¹⁴–Tyr³⁵ с $U_{\text{общ}} = 1,8$ ккал/моль не отвечает важному геометрическому критерию, о котором будет говориться ниже.

Молекула трипсинового ингибитора содержит шесть остатков цистеина, которые образуют в нативной структуре три дисульфидных мостика: Cys⁵–Cys⁵⁵, Cys³⁴–Cys³⁸ и Cys³⁰–Cys⁵¹ (см. рис. IV.5). Исследование пространственного строения БПТИ проводилось, как уже отмечалось, для линейной последовательности без каких-либо предположений о локализации S–S-связей. Считалось, что сближенность соответствующих остатков Cys является следствием детерминированного процесса укладки пептидной цепи в наиболее предпочтительную по энергии межостаточных взаимодействий структуру. Поэтому рассматриваемые расчетные данные о конформационных состояниях линейного и циклического фрагментов Cys¹⁴–Cys³⁸ представляют интерес не только в изучении трехмерной структуры БПТИ, но и в более общем плане. Рассмотрев пространственное строение линейного фрагмента Cys¹⁴–Cys³⁸, перейдем к одному из наиболее интересных этапов исследования – выяснению стерической

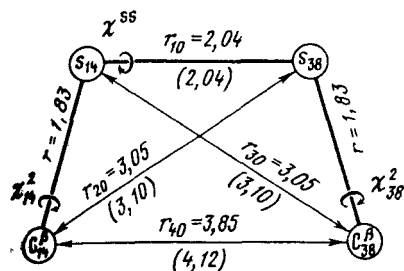


Рис. IV.14. Геометрия дисульфидного мостика в *gauche*-конформации [12]

В скобках приведены расчетные значения геометрических параметров мостика $S_{14}-S_{38}$ молекулы БПТИ

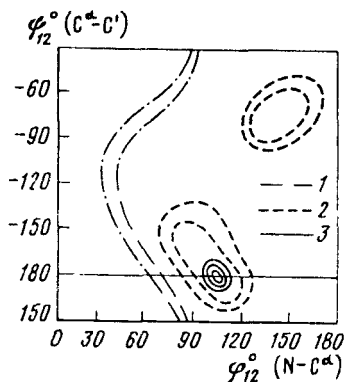


Рис. IV.15. Сечения ϕ - ψ остатка Gly^{12} (1), фрагмента Arg^1-Cys^{14} (2) и фрагмента Arg^1-Cys^{38} (3) молекулы БПТИ

предрасположенности найденной конформации к образованию дисульфидной связи между Cys^{14} и Cys^{38} . Для образования дисульфидной связи между этими остатками в низкоэнергетических конформациях $Cys^{14}-Cys^{38}$ ($U_{общ} = 0$ и $3,0$ ккал/моль) была выбрана использованная уже ранее процедура, предложенная в работе [12]. Найденные геометрические параметры дисульфидного мостика в глобальной конформации фрагмента приведены на рис. IV.14. Связи $C_{(14)}^{\beta}-S_{(14)}$ и $C_{(38)}^{\beta}-S_{(38)}$ сближены и имеют *gauche*-ориентацию, а угол вращения вокруг связи $S_{(14)}-S_{(38)}$ (χ^{S-S}) равен 100° , что отвечает вкладу торсионной составляющей $< 1,0$ ккал/моль. Конформационная энергия фрагмента $Cys^{14}-Cys^{38}$ с S-S-мостиком практически совпадает с энергией линейного фрагмента. Следовательно, образование дисульфидной связи не нарушило стабилизирующих контактов, сложившихся в линейной конформации с величиной $U_{общ} = 0$ ккал/моль. У другой низкоэнергетической конформации линейной последовательности $Cys^{14}-Cys^{38}$ ($U_{общ} = 3,0$ ккал/моль) остаток Cys^{14} имеет R-форму основной цепи. В этом случае боковая цепь Cys^{14} повернута от Cys^{38} и расстояние между атомами $S_{(14)}$ и $S_{(38)}$ составляет $5,5-7,0$ Å в зависимости от значения угла τ . При наложении стягивающего потенциала образование дисульфидной связи $S_{(14)}-S_{(38)}$ происходит за счет перехода R-формы основной цепи Cys^{14} в V-форму, т.е. путем инверсии конформации $Cys^{14}-Cys^{38}$ с $U_{общ} = 3,0$ ккал/моль в конформацию с $U_{общ} = 0$ ккал/моль. Таким образом, только глобальная структура линейной последовательности $Cys^{14}-Cys^{38}$ обнаруживает предрасположенность к созданию дисульфидной связи между остатками Cys^{14} и Cys^{38} . Приход к единственной циклической структуре $Cys^{14}-Cys^{38}$ автоматически исключает из дальнейшего рассмотрения все конформационные состояния фрагмента Arg^1-Tyr^{21} , кроме одно-

го с энергией $U_{\text{общ}} = 2,1$ ккал/моль (см. табл. IV.9). Следовательно, расчет структуры участка $\text{Arg}^1\text{-Cys}^{38}$ сводится к поиску наилучшей упаковки друг относительно друга всего двух конформаций фрагментов $\text{Arg}^1\text{-Cys}^{14}$ и $\text{Cys}^{14}\text{-Cys}^{38}$. Объединение их в единую структуру приводит, однако, к резкому повышению энергии, вызванному образованием многочисленных неблагоприятных контактов между найденными конформациями участков $\text{Phe}^4\text{-Gly}^{12}$ и $\text{Phe}^{33}\text{-Gly}^{37}$. Причина стерических затруднений заключается в том, что расчетная конформация $\text{Cys}^{14}\text{-Cys}^{38}$ не является классической β -структурой. Нисходящая и восходящая ветви в ней располагаются не строго антипараллельно, а, обладая несколько изогнутой формой, огибают друг друга и образуют сегмент неправильной двойной спирали с большим шагом. В результате сближенным с участком $\text{Phe}^4\text{-Gly}^{12}$ на расстояния, значительно меньшие сумм ван-дер-ваальсовых радиусов, оказывается наиболее удаленный по цепи участок $\text{Phe}^{33}\text{-Gly}^{37}$.

Возникшие стерические осложнения нельзя снять без разрушения циклической β -структуры. Была предпринята попытка ликвидировать стерические препятствия путем изменения, по возможности минимального, геометрии линейного фрагмента $\text{Arg}^1\text{-Cys}^{14}$. С этой целью для входящих в него остатков в поле участка $\text{Arg}^1\text{-Cys}^{38}$ получены семейства сечений потенциальной поверхности ϕ - ψ для тех областей двугранных углов, которые соответствуют глобальной конформации основной цепи $\text{Arg}^1\text{-Cys}^{14}$. Подобная процедура была выполнена ранее при исследовании конформационных возможностей тех же остатков и в той же структуре свободного фрагмента $\text{Arg}^1\text{-Cys}^{14}$ (см. рис. IV.10). Оказалось, что варьирование в указанных пределах двугранных углов у большинства остатков не приводит к понижению конформационной энергии фрагмента $\text{Arg}^1\text{-Cys}^{38}$, т.е. не снимает стерические напряжения. Исключения составили углы ϕ , ψ остатка Gly^{12} , угол ψ остатка Leu^6 и угол ϕ остатка Glu^7 . Последовательные изменения их значений, направляемые и контролируемые в каждом случае сечениями потенциальной поверхности $\phi_{12}\text{-}\psi_{12}$ и $\psi_6\text{-}\phi_7$, и минимизация энергии привели в конечном счете к снятию всех неблагоприятных контактов между $\text{Arg}^1\text{-Cys}^{14}$ и $\text{Cys}^{14}\text{-Cys}^{38}$. Форма основной цепи глобальной конформации $\text{Arg}^1\text{-Cys}^{14}$ осталась при этом прежней, и все изменения двугранных углов, коснувшиеся, главным образом, остатков Gly^{12} , Leu^6 и Glu^7 , произошли в пределах низкоэнергетических областей конформационных карт ϕ - ψ , полученных для свободного фрагмента $\text{Arg}^1\text{-Cys}^{14}$. Иными словами, при снятии стерических осложнений удалось полностью сохранить у тетрадекапептида согласованность всех межостаточных взаимодействий.

На рис. IV.15 приведены совмещенные карты ϕ - ψ свободного и встроенного в $\text{Arg}^1\text{-Cys}^{14}$ и $\text{Arg}^1\text{-Cys}^{38}$ остатка Gly^{12} . Как видно из рисунка, состояния остатка в обоих фрагментах соответствуют области низкой энергии монопептида. У $\text{Arg}^1\text{-Cys}^{14}$ конформационная свобода Gly^{12} уменьшается, и он может принимать значения ϕ , ψ только в двух областях — вблизи 140° , -80° и 100° , 180° , причем первый минимум предпочтительнее второго на 1–2 ккал/моль. На участке $\text{Arg}^1\text{-Cys}^{14}$ различие в энергии двух потенциальных ям возрастает до ~5 ккал/моль, так как при значениях ϕ , $\psi \sim 140^\circ$, -80° у Gly^{12} имеет место сближенность многих остатков фрагментов

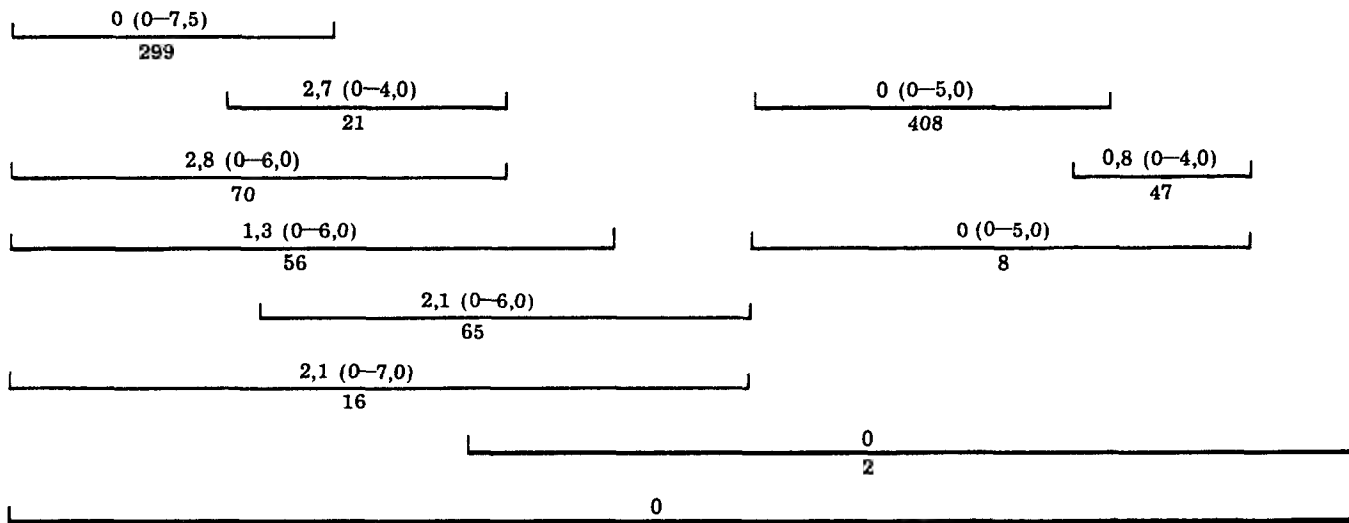
Arg¹-Cys¹⁴ и Cys¹⁴-Tyr²¹ и образование между ними более эффективных, чем при ~100, 180°, стабилизирующих взаимодействий. Однако эти взаимодействия, как было отмечено, невозможны у фрагмента Arg¹-Cys³⁸ при наличии циклической структуры Cys¹⁴-Cys³⁸. Минимум в области $\phi, \psi \sim -140, -80^\circ$ становится запрещенным. При других значениях ϕ, ψ , соответствующих второму минимуму (~100, 180°), частично сохраняются старые контакты между Arg¹-Cys¹⁴ и Cys¹⁴-Tyr²¹ и, кроме того, образуется ряд новых, значительно более эффективных контактов этого участка с β -структурой. Таким образом, несмотря на возникшие затруднения, мы опять-таки приходим к согласованной в отношении всех средних и дальних взаимодействий конформации фрагмента Arg¹-Cys³⁸. О степени согласованности взаимодействий в структуре молекулы БПТИ можно судить по данным, приведенным на рис. IV.16.

Рассчитанная для Arg¹-Cys³⁸ структура совпадает с геометрией этого участка в молекуле БПТИ, полученной с помощью рентгеноструктурного анализа [9, 10].

Фрагмент Arg¹-Ser⁴⁷. Вначале были последовательно рассмотрены конформационные возможности ряда свободных ди-, три-, тетра-, пента- и октапептидов участка Arg³⁹-Ser⁴⁷. Результаты анализа фрагментов Arg³⁹-Lys⁴¹ и Ala⁴⁰-Ser⁴⁷, а также найденная для Arg¹-Cys³⁸ конформация с дисульфидной связью Cys¹⁴-Cys³⁸ были затем использованы для предсказания структуры Arg¹-Ser⁴⁷. Нонапептидная последовательность Arg³⁹-Ser⁴⁷ включает объемные и лабильные остатки Arg³⁹, Lys⁴¹, Arg⁴², Lys⁴⁶, несущие целочисленные положительные заряды, и остатки Asn⁴³, Asn⁴⁴, Phe⁴⁵, также обладающие достаточно объемными и подвижными боковыми цепями. Большая конформационная свобода остатков фрагмента Arg³⁹-Ser⁴⁷ и их способность осуществлять разные по своей природе энергетически эффективные взаимодействия потребовали расчета многочисленных фрагментов постепенно увеличивающейся длины, каждый из которых имел представительный набор структурных вариантов различных форм основной цепи и шейпов.

Расчет показал, что фрагмент Arg³⁹-Ser⁴⁷ в отношении средних взаимодействий является конформационно лабильным участком БПТИ. Хотя выполненный анализ не выявил для этого участка одной формы основной цепи, обладающей бесспорной предпочтительностью по взаимодействиям между входящими в его состав остатками, тем не менее он позволил сократить количество возможных вариантов для последующей оценки дальних взаимодействий, что сделало реальным решение более сложной задачи. В частности, расчет показал, что для Arg³⁹-Ser⁴⁷ более предпочтителен развернутый характер основной цепи. Чрезвычайно мала вероятность образования на этом участке α -спиральных структур, в которых оказываются сближенными все одноименно заряженные остатки аргинина и лизина. Нами также выполнен конформационный анализ свободных пентапептида Gly³⁶-Ala⁴⁰ и гептапептида Tyr³⁵-Lys⁴¹, у которых были рассмотрены состояния всех возможных форм основной цепи соответственно 46 и 64 шейпов. Оказалось, что взаимодействия между остатками в пределах этих фрагментов также не приводят к образованию жестких структур, изоэнергетичными являются практически все структурные вариан-

Arg ¹	Pro ²	Asp ³	Phe ⁴	Cys ⁵	Leu ⁶	Glu ⁷	Pro ⁸	Pro ⁹	Tyr ¹⁰	Thr ¹¹	Gly ¹²	Pro ¹³	Cys ¹⁴	Lys ¹⁵	Ala ¹⁶	Arg ¹⁷	Ile ¹⁸	Ile ¹⁹	Arg ²⁰	Tyr ²¹	Phe ²²	Tyr ²³	Asn ²⁴	Ala ²⁵	Lys ²⁶	Ala ²⁷	Gly ²⁸	Leu ²⁹	Cys ³⁰	Gln ³¹	Thr ³²	Phe ³³	Val ³⁴	Tyr ³⁵	Gly ³⁶	Gly ³⁷	Cys ³⁸
------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------



Р и с. IV.16. Схема расчета конформаций фрагмента Arg¹–Cys³⁸ молекулы БПТИ

Для каждого участка последовательности приведены под чертой – количество рассчитанных структурных вариантов, над чертой – относительная энергия состояния, вошедшего в глобальную конформацию Arg¹–Cys³⁸, и энергетический интервал отбора конформаций (в скобках, ккал/моль)

с В- и R-состояниями остатков. Результаты расчета позволяют предположить, что детерминация конформационного состояния последовательности БПТИ на участке Cys³⁸-Ser⁴⁷ осуществляется главным образом за счет дальних взаимодействий, обеспечивающих при сборке нативной структуры белка плотную упаковку этого фрагмента с более сложившейся конформацией предшествующего участка Arg¹-Cys³⁸. Вследствие большого количества низкоэнергетических по средним взаимодействиям конформационных состояний Cys³⁸-Ser⁴⁷ дальнейший риск наиболее предпочтительной структуры участка Arg¹-Ser⁴⁷ заключается в последовательной генерации цепи, начиная с Cys³⁸, и количественной оценке взаимодействий присоединяемых остатков с уже найденной для Arg¹-Cys³⁸ структурой. При наращивании белковой цепи сначала до Lys⁴¹, затем до Arg⁴², Asn⁴⁴, Lys⁴⁶ и, наконец, до Ser⁴⁷ учитывались конформационные состояния остатков фрагмента Cys³⁸-Ser⁴⁷, отвечающих низкоэнергетическим вариантам свободных фрагментов Arg³⁹-Lys⁴¹, Ala⁴⁰-Ser⁴⁷ и Tyr³⁵-Lys⁴¹.

При рассмотрении участка Arg¹-Lys⁴¹ оценены взаимодействия большого набора конформационных состояний Cys³⁸-Lys⁴¹ с жесткой структурой Arg¹-Cys³⁸. У присоединяемого фрагмента учитывались В- и R-формы остатка Cys³⁸ и все комбинации В-, R- и L-форм основной цепи остатков Arg³⁹, Ala⁴⁰ и Lys⁴¹, составляющих максимально возможные для тетрапептида восемь шейпов пептидного скелета, а также полученные из предшествующего анализа конформационные состояния боковых цепей Arg³⁹ и Lys⁴¹. Найденные величины относительной энергии конформаций участка Arg¹-Lys⁴¹, попадающие в интервал 0-20,0 ккал/моль, приведены в табл. IV.11. Расчет свидетельствует о высокой чувствительности конформационной энергии Arg¹-Lys⁴¹ к структуре фрагмента Cys³⁸-Lys⁴¹. Из сотен рассмотренных вариантов в указанный широкий энергетический интервал попали лишь восемь конформационных состояний Arg¹-Lys⁴¹. Низкоэнергетическими являются только две конформации с $U_{\text{общ}} = 0$ и 2,2 ккал/моль. Они имеют одинаковые (В³⁸-L³⁹) состояния дипептида Cys³⁸-Arg³⁹, которые обеспечивают поворот основной цепи, сближенность фрагмента Arg³⁹-Lys⁴¹ с предшествующими остатками и образование с ними многочисленных стабилизирующих контактов. В расчете фрагмента Arg¹-Arg⁴² приняты во внимание все конформации Arg¹-Lys⁴¹, приведенные в табл. IV.11. Для Arg⁴² варьировали допустимые по средним взаимодействиям положения его боковой цепи при В- и R-формах остатка. В интервал 0-20,0 ккал/моль попали 28 структурных вариантов. Самыми предпочтительными оказались структуры Arg¹-Arg⁴² с состояниями С-концевого пентапептида В³⁸-L³⁹₃₂₂₂-В⁴⁰-В⁴¹₃₂₂₂-R⁴²₃₂₂₂ ($U_{\text{общ}} = 0$ ккал/моль) шейпа f_3 и В³⁸-L³⁹₃₂₂₂-В⁴⁰-R⁴¹₃₂₂₂-В⁴²₃₂₂₂ ($U_{\text{общ}} = 0,1$ ккал/моль) шейпа fe_2f .

Исходные структурные варианты фрагмента Arg¹-Asn⁴⁴ сформированы из 28 конформаций фрагмента Arg¹-Arg⁴² с относительной энергией от 0 до 20,0 ккал/моль и (В-R)- и (R-R)-форм дипептидного участка Asn⁴³-Asn⁴⁴ с ориентациями боковых цепей, выгодными по средним взаимодействиям. Результаты минимизации энергии при варьировании двух углов основной и боковой цепей лабильного участка Cys³⁸-Asn⁴⁴

**Относительная энергия (ккал/моль) конформаций фрагментов
Arg¹-Lys⁴¹, Arg¹-Asn⁴⁴ и Arg¹-Lys⁴⁶ молекулы БПТИ**

Arg ¹ -Lys ⁴¹		
Cys ³⁸ -Lys ⁴¹		<i>U</i> _{общ}
Шейп	Конформация	
<i>fef</i>	B ³⁸ -L ³⁹ -R ⁴⁰ -B ⁴¹	0
<i>fe₂</i>	B -L -B -B	2,2
<i>e₂f</i>	B -B -R -B	12,4
<i>ef₂</i>	B -R -R -B	12,8
<i>efe</i>	B -B -L -B	15,5
	B -R -R -B	16,7
<i>e₃</i>	B -B -B -B	16,7
	B -R -L -B	19,2
Arg ¹ -Asn ⁴⁴		
Cys ³⁸ -Asn ⁴⁴		<i>U</i> _{общ}
Шейп	Конформация	
<i>fe₃fe</i>	B ³⁸ -L ³⁹ -B ⁴⁰ -B ⁴¹ -R ⁴² -B ⁴³ -B ⁴⁴	0
<i>fe₂e₂</i>	B -L -R -R -B -B -B	8,0
<i>fe₄</i>	B -L -R -R -R -R -B	8,3
<i>fe₂ef</i>	B -L -R -R -B -R -B	9,6
<i>fe₂e₂f</i>	B -L -R -B -B -R -B	10,2
<i>fe₂e₃</i>	B -L -R -B -B -B -B	10,6
<i>fe₂efe</i>	B -L -R -B -R -B -B	11,2
<i>e₄fe</i>	B -B -B -B -R -B -B	11,3
Arg ¹ -Lys ⁴⁶		
Cys ³⁸ -Lys ⁴⁶		<i>U</i> _{общ}
Шейп	Конформация	
<i>fe₃fe₃</i>	B ³⁸ -L ³⁹ -B ⁴⁰ -B ⁴¹ -R ⁴² -B ⁴³ -B ⁴⁴ -B ⁴⁵ -R ⁴⁶	0
<i>fe₂fe₂f</i>	B -L -R -B -R -B -B -R -R	9,0
<i>fe₂fe₂e₃</i>	B -L -R -B -R -B -B -B -R	9,4
<i>fe₂fe₄</i>	B -L -R -B -R -R -R -R -R	9,8
<i>fe₂fe₃e</i>	B -L -R -B -R -R -R -B -R	10,2
<i>fe₂e₂f</i>	B -L -R -R -B -B -B -R -R	10,8
<i>fe₂fe₂ef</i>	R -L -R -R -B -R -B -R -R	10,8
<i>fe₂e₂f₃</i>	B -L -R -B -B -R -R -R -R	11,1

Примечание. Во всех конформациях фрагментов Arg¹-Lys⁴¹, Arg¹-Asn⁴⁴ и Arg¹-Lys⁴⁶ участок Arg¹-Cys³⁸ имеет одинаковую структуру. Различия в величинах энергии С-концевых остатков при В- и R-формах не превышают 1,0 ккал/моль.

низкоэнергетических вариантов (0–12,0 ккал/моль) представлены табл. IV.11. Расчет выявил у фрагмента Arg¹–Asn⁴⁴ лишь одну предпочтительную конформацию, которая отвечает лучшим состояниям фрагментов Arg¹–Arg⁴² и Arg¹–Lys⁴¹, а также низкоэнергетическому по межостаточным взаимодействиям состоянию свободного участка Cys³⁸–Asn⁴⁴. Однако предпочтительность глобальной структуры обусловлена прежде всего наилучшей комплементарностью между конформацией Cys³⁸–Asn⁴⁴ шейпа fe_3fe и одной из самых низкоэнергетических конформаций фрагмента Arg¹–Cys³⁸. Только в этом случае все остатки первого фрагмента, не нарушая средних взаимодействий, образуют многочисленные стабилизирующие контакты с удаленными остатками, суммарный энергетический эффект их составляет –27,1 ккал/моль. Распределение конформаций фрагмента Arg¹–Lys⁴⁶ по энергии не претерпевает серьезных изменений при удлинении белковой цепи на два остатка (Phe⁴⁵–Lys⁴⁶). Самая выгодная структура Arg¹–Lys⁴⁶ (fe_3fe_3 ; $U_{\text{общ}} = 0$ ккал/моль; табл. IV.11) представляет собой комбинацию глобальной конформации Arg¹–Asn⁴⁴ и (B₃₁–R₃₂₂₂) состояния Phe⁴⁵–Lys⁴⁶. В этом случае присоединенный участок оказывается сближенным с тетрапептидным фрагментом Arg²⁰–Tyr²³. Стабилизирующие контакты с удаленными в последовательности остатками образует также Lys⁴⁶.

Таким образом, постепенная генерация белковой последовательности и анализ на каждом этапе большого числа конформационных состояний фрагментов Arg¹–Lys⁴¹, Arg¹–Arg⁴², Arg¹–Asn⁴⁴ и Arg¹–Lys⁴⁶ привели в конечном счете к выделению из многочисленных, практически изоэнергетичных структурных вариантов свободного участка Cys³⁸–Ser⁴⁷ единственной реальной трехмерной структуры фрагмента Arg¹–Lys⁴⁶. Ее однозначная детерминация определяется предпочтительностью участка Cys³⁸–Lys⁴⁶ образовывать стабилизирующие контакты с удаленными по цепи остатками и согласованностью между всеми средними и дальними взаимодействиями. Присоединение остатка Ser⁴⁷, обладающего небольшой боковой цепью, естественно, не может существенно повлиять на энергетическое распределение конформаций фрагмента Arg¹–Ser⁴⁷ по сравнению с фрагментом Arg¹–Lys⁴⁶. Учитывая это обстоятельство и большой разрыв в энергии глобальной и следующих за ней структур, для дальнейшего анализа пространственного строения молекулы БПТИ оставлена лишь конформация Arg¹–Lys⁴⁶ типа fe_3fe_3 ($U_{\text{общ}} = 0$ ккал/моль) (см. табл. IV.11).

Фрагмент Ala⁴⁸–Ala⁵⁸. Конформационный анализ ундекапептидного участка БПТИ Ala⁴⁸–Ala⁵⁸ выполнен по схеме, согласно которой вначале рассчитывались шесть перекрывающихся дипептидных фрагментов и фрагменты Ala⁴⁸–Asp⁵⁰, Asp⁵⁰–Met⁵² и Cys⁵⁵–Ala⁵⁸. Полученные для них данные явились исходными для расчета пентапептида Ala⁴⁸–Met⁵², который, в свою очередь, вместе с дипептидами Met⁵²–Arg⁵³ и Arg⁵³–Thr⁵⁴ стал базовым для анализа гептапептида Ala⁴⁸–Thr⁵⁴. Результаты его расчета и данные по фрагментам Thr⁵⁴–Cys⁵⁵ и Cys⁵⁵–Ala⁵⁸ позволили оценить конформационные возможности всего ундекапептидного участка Ala⁴⁸–Ala⁵⁸. Структурные варианты фрагмента Ala⁴⁸–Thr⁵⁴ составили 96 конформаций с 42 различными формами основной цепи, принадлежащими 28 шейпам. Результаты минимизации их энергии свидетельствуют о том, что увели-

чение длины цепи от пента- до гептапептида сопровождается резкой де-терминацией α -спиральной формы основной цепи. В широкий энергетический интервал 0–5,0 ккал/моль попадают 25 конформаций с одной и той же формой основной цепи $R^{48}-R^{49}-R^{50}-R^{51}-R^{52}-R^{53}-R^{54}$ (f_6) и лишь одна конформация родственного типа f_{5e} с величиной $U_{\text{общ}} = 4,4$ ккал/моль. Таким образом, расчет показал, что единственной реальной формой основной цепи гептапептида $\text{Ala}^{48}-\text{Thr}^{54}$ является α -спираль. Это вызвано не только более эффективными контактами между элементами пептидной цепи, но и взаимодействиями боковых цепей, которые в α -спиральной форме основной цепи гептапептида $\text{Ala}^{48}-\text{Thr}^{54}$ становятся более выгодными, чем при других формах. В полностью свернутой структуре типа f_6 ($U_{\text{общ}} = 0$ ккал/моль) положительно заряженная боковая цепь Arg^{53} пространственно сближена с боковыми цепями Glu^{49} и Asp^{50} , несущими отрицательные заряды, и образует с ними исключительно эффективные контакты (–16,2 ккал/моль), взаимодействуя одновременно и с основными цепями этих остатков (–3,9 ккал/моль). Рассчитанные конформационные параметры $\text{Ala}^{48}-\text{Thr}^{54}$ совпадают с опытными значениями с точностью рентгеноструктурного анализа белков с высоким разрешением. Совпадение имеет место в отношении всех двугранных углов основной цепи (ϕ , ψ , ω) и углов χ_1 , χ_2 боковых цепей. Энергия расчетной конформации, полностью отвечающая геометрии участка $\text{Ala}^{48}-\text{Thr}^{54}$ в кристалле, лишь немного уступает глобальной структуре свободного гептапептида.

Таким образом, конформационный анализ $\text{Ala}^{48}-\text{Thr}^{54}$ и сопоставление результатов расчета с экспериментальными данными приводят к заключению об образовании у гептапептидного фрагмента за счет взаимодействий между его остатками жесткой структуры, которая без существенных конформационных перестроек входит в нативную трехмерную структуру белка.

Для дальнейшего расчета оставлены 12 конформаций фрагмента $\text{Ala}^{48}-\text{Thr}^{54}$ с формой основной цепи $R^{48}-R^{49}-R^{50}-R^{51}-R^{52}-R^{53}-R^{54}$ (f_6) и по одной конформации с формами $R^{48}-R^{49}-R^{50}-R^{51}-R^{52}-R^{53}-R^{54}$ (f_{5e}), $R^{48}-R^{49}-R^{50}-R^{51}-R^{52}-R^{53}-R^{54}$ (f_{4ef}) и $R^{48}-R^{49}-R^{50}-R^{51}-R^{52}-R^{53}-R^{54}$ (f_{4e2}). Нулевые приближения ундекапептида $\text{Ala}^{48}-\text{Ala}^{58}$ получены стыковкой указанных конформаций гептапептида $\text{Ala}^{48}-\text{Thr}^{54}$ с 37 конформациями тетрапептида $\text{Cys}^{55}-\text{Ala}^{58}$. Поскольку в расчете первого фрагмента для Thr^{54} учитывалось только одно состояние R (B-состояние для C-концевого остатка изознергетично R, а L отвечает высокоэнергетичным конформациям дипептидов $\text{Arg}^{53}-\text{Thr}^{54}$ и $\text{Thr}^{54}-\text{Cys}^{55}$), в расчете ундекапептида принимались во внимание состояния R и B этого остатка. Всего для $\text{Ala}^{48}-\text{Ala}^{58}$ рассчитано 129 структурных вариантов, принадлежащих 22 шейпам пептидного скелета. Относительной энергией менее 8,0 ккал/моль обладают структуры трех шейпов. Лучшие из них имеют конформационные состояния гептапептидного участка $\text{Ala}^{48}-\text{Thr}^{54}$, отвечающие глобальной конформации свободного фрагмента шейпа f_6 ($U_{\text{общ}} = 0$ ккал/моль), а у тетрапептидного участка $\text{Cys}^{55}-\text{Ala}^{58}$ – конформациям свободного фрагмента соответственно $R^{55}-R^{56}-H^{57}-R^{58}$, $R^{55}-R^{56}-L^{57}-R^{58}$ и $R^{55}-R^{56}-R^{57}-R^{58}$ шейпов f_{ef} , f_{e2} и f_3 . Следовательно, образование низко-

энергетической конформации ундекапептида происходит путем подстройки лабильного тетрапептида к конформационно жесткой микроглобуле, образованной гептапептидом, причем остатки Cys⁵⁵ и Gly⁵⁶ во всех низкоэнергетических состояниях фрагмента Ala⁴⁸–Ala⁵⁸ входят в α -спираль. Комплементарными к спиральной форме оказываются не более четырех состояний дипептида Gly⁵⁷–Ala⁵⁸ (H–R, L–R, R–R и B–R). В этом заключается причина резкой энергетической дифференциации конформаций фрагмента Ala⁴⁸–Ala⁵⁸.

Фрагмент Ala⁴⁸–Ala⁵⁸ содержит два остатка Cys, которые располагаются друг против друга в соседних витках α -спирали. Сближение атомов S₍₅₁₎ и S₍₅₅₎ на валентное расстояние приводит к искажению структуры и повышению конформационной энергии более чем на 15 ккал/моль вследствие несогласованности взаимодействий. Поэтому образование дисульфидной связи Cys⁵¹–Cys⁵⁵ представляется маловероятным.

Молекула БПТИ. Полученные данные о конформационных возможностях фрагментов БПТИ позволили перейти непосредственно к расчету трехмерной структуры всей молекулы белка. Для этого необходимо было определить конформационное состояние лабильного участка Cys⁴⁶–Ser⁴⁷–Ala⁴⁸, обеспечивающее одновременно как энергетически наиболее предпочтительное взаимное расположение конформационно жестких фрагментов Arg¹–Lys⁴⁶ и Ala⁴⁸–Ala⁵⁸, так и образование двух дисульфидных связей между остатками Cys³⁰–Cys⁵¹ и Cys⁵–Cys⁵⁵. Сначала выполнен расчет фрагмента Arg¹–Ala⁴⁸ путем перебора всех возможных низкоэнергетических состояний трипептида Lys⁴⁶–Ala⁴⁸ в потенциальном поле жесткой структуры Arg¹–Lys⁴⁶ (см. табл. IV.11). Далее были рассмотрены конформации фрагмента Arg¹–Cys⁵¹, начальные приближения которых образованы из низкоэнергетических структурных вариантов Arg¹–Ala⁴⁸ и α -спирального сегмента Ala⁴⁸–Cys⁵¹. У рассчитанных конформаций Arg¹–Cys⁵¹ оценивалась потенция к образованию S–S-мостиков между Cys⁵¹, с одной стороны, и Cys⁵ и Cys³⁰, с другой. На заключительном этапе исследовалась трехмерная структура всей молекулы и определялась локализация дисульфидной связи с участием Cys⁵⁵.

При рассмотрении конформационных возможностей участка Arg¹–Cys⁵¹ приняты во внимание 14 структурных вариантов Arg¹–Ala⁴⁸ с величинами $U_{\text{общ}} = 0\text{--}4,6$ ккал/моль. Минимизация энергии фрагмента Arg¹–Cys⁵¹ при варьировании двугранных углов основной и боковых цепей Cys³⁸–Cys⁵¹ выявила резкую дифференциацию конформаций. Как видно из табл. IV.12, структурные варианты, ближайшие к глобальной конформации, имеют на 1,0–20,0 ккал/моль более высокую энергию. Важно, что столь значительное различие в конформационной энергии фрагмента Arg¹–Cys⁵¹ связано с невалентными взаимодействиями его небольшого участка Lys⁴⁶–Cys⁵¹ с Arg¹–Lys⁴⁶. В конформации Lys⁴⁶–Cys⁵¹ с формой основной цепи ⁴⁶B⁴⁷–R⁴⁸–R⁴⁹–R⁵⁰–R⁵¹ ($U_{\text{общ}} = 0$ ккал/моль) α -спиральный сегмент Ala⁴⁸–Ile⁴⁹–Asp⁵⁰–Cys⁵¹ оказывается сближенным со многими остатками и осуществляет с ними эффективные стабилизирующие взаимодействия как дисперсионной, так и электростатической природы.

Следующий этап теоретического конформационного анализа трипсинового ингибитора является одним из наиболее ответственных, узловых мо-

Относительная энергия и расстояния между атомами S^β остатков Cys⁵, Cys³⁰ и Cys⁵¹ в конформациях фрагмента Arg¹-Cys⁵¹ молекулы БПТИ

Конформация	Расстояние, Å		$U_{\text{общ}}$, ккал/моль
	$C_{(5)}^\beta \cdots C_{(51)}^\beta$	$C_{(30)}^\beta \cdots C_{(51)}^\beta$	
$R_{3222}^{46}-B_{12}^{47}-R_{48}^{49}-R_{311}^{49}-R_{31}^{50}-R_2^{51}$	8,6	4,5	0
$B_{3222}-B_{22}-R-R_{311}-R_{31}-R_2$	13,7	9,3	14,3
$R_{3222}-R_{12}-B-R_{311}-R_{31}-R_2$	11,9	8,6	14,6
$B_{3222}-R_{12}-R-R_{311}-R_{31}-R_2$	10,9	4,9	14,9
$B_{3222}-R_{22}-B-R_{311}-R_{31}-R_2$	18,9	13,2	15,1
$R_{3222}-R_{22}-R-R_{311}-R_{31}-R_2$	19,8	16,5	16,3
$B_{3222}-B_{22}-B-R_{311}-R_{31}-R_2$	20,9	13,1	19,7
$B_{3222}-B_{22}-L-R_{311}-R_{31}-R_2$	20,6	14,7	19,9

Примечание. Во всех конформациях фрагментов Arg¹-Cys⁵¹ участок Arg¹-Phe⁴⁵ имеет одинаковую структуру.

ментов данного исследования. Он контролирует результаты всех предшествующих расчетов и тем самым правильность положенных в их основу принципов пространственной организации белка и возможности использованного метода. Речь идет о независимой от эксперимента идентификации системы дисульфидных связей в молекуле БПТИ и выяснении стерических условий их образования у рассчитанных конформаций белкового участка Arg¹-Cys⁵¹ (см. табл. IV.12). При анализе фрагмента Arg¹-Cys³⁸ обнаружено, что только в самой низкоэнергетической структуре линейной последовательности остатки Cys¹⁴ и Cys³⁸ оказываются сближенными. Создание между ними S-S-связи не приводит к существенному изменению геометрии фрагмента и не нарушает сложившихся стабилизирующих межостаточных взаимодействий. В последующих расчетах предполагалось наличие валентного мостика Cys¹⁴-Cys³⁸. Было показано также отсутствие стерических условий для образования дисульфидной связи между Cys⁵ и Cys³⁰. Расстояние между S-атомами этих остатков в низкоэнергетической структуре Arg¹-Cys³⁰, имеющей мостик Cys¹⁴-Cys³⁸, составляет ~ 10 Å. Их сближение сопровождается рассогласованностью стабилизирующих взаимодействий и возникновением напряженности. При конформационном анализе фрагмента Ala⁴⁸-Ala⁵⁸ выяснилась невозможность образования дисульфидной связи между противостоящими друг другу в соседних витках α-спирали остатками Cys⁵¹ и Cys⁵⁵. Итак, для решения вопроса о системе дисульфидных связей в молекуле БПТИ на основе данных теоретического анализа нам осталось рассмотреть стерические условия их образования между боковыми цепями остатков Cys⁵ и Cys³⁰, с одной стороны, и Cys⁵¹ и Cys⁵⁵ – с другой. На участке Arg¹-Cys⁵¹ возможно оценить конформационные предпосылки создания S-S-мостика между Cys⁵¹ и Cys⁵ или Cys³⁰.

В табл. IV.12 приведены расстояния $C_{(5)}^\beta \cdots C_{(51)}^\beta$ и $C_{(30)}^\beta \cdots C_{(51)}^\beta$ в конфор-

мациях Arg¹-Cys⁵¹ с величинами $U_{\text{общ}} = 0-20,0$ ккал/моль. Напомним, что при их расчете не было сделано предположения о способе замыкания S-S-связей. Наименьшие расстояния между валентно несвязанными остатками цистеина, особенно в положениях 30 и 51, имеют глобальная конформация фрагмента Arg¹-Cys⁵¹ и конформация с $U_{\text{общ}} = 14,9$ ккал/моль. Все попытки сблизить у конформаций с величинами $U_{\text{общ}} = 14,0-20,0$ ккал/моль остаток Cys⁵¹ с остатком Cys⁵ или Cys³⁰ путем наложения стягивающего потенциала между соответствующими атомами серы или предоставления свободы двугранным углам ϕ , ψ на участке Cys⁴⁸-Cys⁵¹ фрагмента Arg¹-Cys⁵¹ неизменно приводили к резкому увеличению энергии. При фиксировании отмеченных структурных вариантов фрагмента Arg¹-Cys⁵¹ конформации трипептидного участка Lys⁴⁶-Ala⁴⁸ (что не исключает возможности значительных изменений его углов ϕ , ψ в пределах областей В и R) образование дисульфидных связей S₍₅₁₎-S₍₅₎ и S₍₅₁₎-S₍₃₀₎ может осуществляться только при значительной дестабилизации средних и дальних взаимодействий и нарушении согласованности между ними, т.е. при энергетически невыгодных ситуациях. В этой группе конформаций мостик Cys⁵¹-Cys³⁰ легко образуется только у структуры с величиной $U_{\text{общ}} = 14,9$ ккал/моль. Но и здесь конформационная энергия остается значительно выше (> 15 ккал/моль) энергии глобальной конформации.

Не привели к положительным результатам и попытки создать дисульфидную связь Cys⁵-Cys⁵¹ в самой низкоэнергетической структуре фрагмента Arg¹-Cys⁵¹. Сближение атомов C^β₍₅₎ и C^β₍₅₁₎ неизменно сопровождается повышением энергии, которое при расстоянии 5,3 Å достигает 15 ккал/моль; стремление установить между остатками Cys⁵¹ и Cys⁵ еще более тесный контакт вызывает прогрессирующий рост энергии из-за многочисленных стерических препятствий. Совершенно иное положение складывается при образовании у глобальной конформации Arg¹-Cys⁵¹ дисульфидного мостика Cys³⁰-Cys⁵¹. Уменьшение расстояния между атомами серы вплоть до длины валентной связи не встречает серьезных стерических осложнений и не вызывает заметного ослабления сложившихся до образования цикла невалентных межостаточных взаимодействий. Энергия этой конформации в бициклическом варианте выше энергии соответствующего моноциклического состояния всего на 2,0 ккал/моль, а геометрические параметры обоих дисульфидных мостиков практически совпадают с экспериментальными значениями ($r_{\text{S-S}} = 2,04$; $r_{\text{S-C}^\beta} = 3,05$ Å; $\tau_{\text{(C}^\beta\text{SS)}} = 104^\circ$ [7]). Уникальную у глобальной структуры Arg¹-Cys⁵¹ стерическую комплементарность соответствующих участков белковой молекулы, их склонность к образованию такой структуры, которая неизбежно (т.е. в самом выгодном линейном структурном варианте) приводит к сближенности остатки Cys³⁰ и Cys⁵¹ и обеспечивает беспрепятственное образование еще более тесного контакта между ними, подтверждают и попытки создать дисульфидную связь Cys³⁰-Cys⁵¹, исходя из высокоэнергетических конформаций фрагмента.

Таким образом, рассмотрение конформационного состояния участка Arg¹-Cys⁵¹ привело к заключению о возможности реализации у этого

**Расчетные значения геометрических параметров
дисульфидных мостиков в оптимальной конформации
молекулы БПТИ**

Дисульфидный мостик	Расстояние между атомами, Å		
	S_i-S_j	$C_i^\beta \dots S_j$	$C_j^\beta \dots S_i$
$\text{Cys}^{14}-\text{Cys}^{38}$	2,04	3,1	3,1
$\text{Cys}^{30}-\text{Cys}^{51}$	2,04	3,0	3,0
$\text{Cys}^5-\text{Cys}^{55}$	1,98	3,1	3,1

фрагмента только одного низкоэнергетического бициклического структурного варианта с дисульфидными связями $\text{Cys}^{14}-\text{Cys}^{38}$ и $\text{Cys}^{30}-\text{Cys}^{51}$. Его параметры и α -спиральный участок $\text{Cys}^{51}-\text{Gly}^{56}$ использованы в качестве начального приближения для выяснения структуры фрагмента $\text{Arg}^1-\text{Gly}^{56}$ и возможности образования S-S-мостика между остатками Cys^5 и Cys^{55} . Стерическая предрасположенность составленной таким образом конформации $\text{Arg}^1-\text{Gly}^{56}$ проявляется в сближенности боковых цепей Cys^5 и Cys^{55} (расстояние между атомами $C_{(5)}^\beta$ и $C_{(55)}^\beta$ не превышает 5,2 Å) и в отсутствии неблагоприятных контактов. Сближение атомов $S_{(5)}$ и $S_{(55)}$ на валентное расстояние при одновременной минимизации энергии с варьированием двугранных углов участка $\text{Cys}^{51}-\text{Gly}^{56}$ не вызывает, как и в случаях образования дисульфидных мостиков $\text{Cys}^{14}-\text{Cys}^{38}$ и $\text{Cys}^{30}-\text{Cys}^{51}$, существенного изменения конформационных состояний остатков и рассогласованности сложившихся между ними ранее взаимодействий. Найденные геометрические параметры мостика $\text{Cys}^5-\text{Cys}^{55}$ (табл. IV.13) совпадают с экспериментальными значениями.

На последнем этапе анализа молекулы БПТИ рассмотрены конформационные возможности С-концевого дипептида $\text{Gly}^{57}-\text{Ala}^{58}$ в потенциальном поле рассчитанной структуры $\text{Arg}^1-\text{Gly}^{56}$. Полученные результаты свидетельствуют о подвижности этого участка, который может находиться в четырех практически изоэнергетичных состояниях: Н-Р, В-Р, L-Р и R-Р.

16.2. ТЕОРИЯ, ЭКСПЕРИМЕНТ, ВЫВОДЫ

Итак, теоретический конформационный анализ трехмерной структуры белковой молекулы обсужден. Получена уникальная возможность впервые проконтролировать данные априорного расчета прямым сравнением их значений с экспериментальными данными. В табл. IV.14 приведены рассчитанные величины 298 двугранных углов ϕ , ψ , ω и χ , определяющих конформационные состояния основных и боковых цепей всех 58 аминокислот.

Экспериментальные* и теоретические значения
конформационных параметров (град) молекулы БПТИ

Аминокислотный остаток	Основная цепь			Боковая цепь			
	φ	ψ	ω	χ_1	χ_2	χ_3	χ_4
1	2	3	4	5	6	7	8
Arg ¹	–	144	179	82	–179	56	82
	56	149	175	62	176	62	77
Pro ²	–58	152	177	–174	177	–170	
	–60	140	–177	180	180	180	
Asp ³	–61	–30	–177	–86	5		
	–97	–48	–172	–64	31		
Phe ⁴	–74	–12	169	66	71		
	–64	–24	–172	30	83		
Cys ⁵	–65	–17	176	–56	–88	–87	
	–77	–22	–179	–69			
Leu ⁶	–92	–5	175	–54	–174	–	–
	–111	–14	–176	–42	178	66	62
Glu ⁷	–75	147	175	17	177	73	
	–55	137	180	23	169	90	
Pro ⁸	–67	157	178	–178	–165	162	
	–60	157	–179	180	180	180	
Pro ⁹	–64	145	173	178	–175	157	
	–60	144	178	180	180	180	
Tyr ¹⁰	–126	106	–179	178	77	–	
	–132	110	180	–177	86	180	
Thr ¹¹	–70	–41	173	–77	–	–	
	–85	–61	180	–58	62	179	
Gly ¹²	94	179	–176				
	93	170	179				
Pro ¹³	–86	–7	178	–178	–170	148	
	–60	–29	179	180	180	180	
Cys ¹⁴	–89	165	–170	–73	96	101	
	–88	140	–178	–70			
Lys ¹⁵	–127	32	163	–111	92	–	–
	–125	63	–169	–75	83	151	–168
Ala ¹⁶	–77	178	–171	–			
	–86	173	174	60			
Arg ¹⁷	–134	88	–163	62	162	–137	113
	–120	70	180	–62	–179	180	180
Ile ¹⁸	–125	118	–176	–65	–173	–	–
	–116	152	–170	–56	176	56	61
Ile ¹⁹	–84	118	178	–57	–55	–	–
	–92	105	171	–45	–56	60	61
Arg ²⁰	–126	172	175	–64	–77	177	89
	–130	167	–178	–49	–68	179	–154
Tyr ²¹	–110	146	179	–72	77	–	
	–135	151	180	–30	114	0	

1	2	3	4	5	6	7	8
Phe ²²	-129	151	167	76	100		
	-130	136	-170	81	103		
Tyr ²³	-89	130	-174	-171	-108	-	
	-98	131	176	179	-83	180	
Asn ²⁴	-110	104	-175	173	-11		
	-100	100	-177	-174	-24		
Ala ²⁵	-65	-28	171	-			
	-68	-35	-173	60			
Lys ²⁶	-67	-34	-177	-88	-121	105	-
	-62	-48	176	-87	-81	180	180
Ala ²⁷	-93	-20	-179	-			
	-79	-31	180	60			
Gly ²⁸	81	15	-175				
	79	34	177				
Leu ²⁹	-159	175	-172	44	72	-	-
	-131	193	177	59	84	58	58
Cys ³⁰	-98	146	-177	-68	-122	-90	
	-89	140	169	-74			
Gln ³¹	-133	161	173	-67	178	145	
	-125	160	176	-62	-167	104	
Thr ³²	-83	150	170	53	-	-	
	-106	152	180	70	30	-2	
Phe ³³	-146	166	-179	74	114		
	-150	171	-176	104	106		
Val ³⁴	-96	120	-175	172	-	-	
	-104	128	-176	165	61	86	
Tyr ³⁵	-100	134	178	161	53	-	
	-92	140	-178	-165	49	0	
Gly ³⁶	-73	-11	170				
	-60	-20	174				
Gly ³⁷	105	0	174				
	90	-40	178				
Cys ³⁸	-146	151	178	74	-118	103	
	-154	146	180	45			
Arg ³⁹	61	40	-178	-46	-52	-178	-174
	61	36	-171	-50	-64	-179	180
Ala ⁴⁰	-61	152	177	-			
	-101	180	-176	60			
Lys ⁴¹	-103	180	-172	-88	-165	-175	-
	-84	180	180	-128	-156	165	180
Arg ⁴²	-85	-20	167	-83	-160	110	179
	-82	-17	-177	-60	180	180	180
Asn ⁴³	-77	74	-166	-161	7		
	-75	81	180	-178	82		
Asn ⁴⁴	-166	107	-175	176	-30		
	-170	131	-176	73	-70		
Phe ⁴⁵	-129	158	-177	-56	91		
	-118	160	-177	-64	138		

	2	3	4	5	6	7	8
Lys ⁴⁶	-88	-7	174	-80	160	-142	91
	-98	-28	179	-58	180	-179	60
Leu ⁴⁷	-154	162	179	76	-		
	-151	170	180	54	177		
Ala ⁴⁸	-67	-34	-175	-			
	-61	-23	180	60			
Glu ⁴⁹	-69	-42	173	-73	86	173	
	-52	-43	180	-78	73	88	
Asp ⁵⁰	-65	-41	175	-97	52		
	-71	-35	180	-53	98		
Cys ⁵¹	-59	-50	-179	175	-94	-87	
	-60	-45	-176	180			
Met ⁵²	-71	-32	176	-70	-62	-71	-
	-84	-37	-175	-64	-52	-74	60
Arg ⁵³	-63	-42	175	178	156	37	-125
	-63	-40	-171	171	166	59	-175
Thr ⁵⁴	-76	-46	-173	-60	-	-	
	-71	-66	-173	-62	60	175	
Cys ⁵⁵	-106	-4	-171	-69	-64	-91	
	-114	-20	-169	-65			
Gly ⁵⁶	-78	-14	174				
	-60	-47	-179				
Gly ^{57**}	-	-	-				
	159	-61	-179				
Ala ^{58**}	-	-		-			
	-160	-55		60			

* Приведены в верхних строчках значений параметров для каждого остатка.

** Численные значения этих параметров в работах [9, 10] не приведены.

кислотных остатков молекулы БПТИ. Там же даны экспериментальные значения этих углов, полученные с помощью рентгеноструктурного анализа белка с разрешением 1,5 Å [10]. Из сопоставления видно, что найденная априорно конформация БПТИ полностью соответствует экспериментальной кристаллической структуре. Подавляющее большинство конформационных параметров количественно совпадает между собой. Заметные различия, выходящие за условно принимаемые границы погрешностей рентгеноструктурного анализа в определении двугранных углов белковой цепи (± 10 – 20°), касаются лишь боковых цепей единичных остатков, например Arg²⁰(χ_4), Asn⁴³(χ_2) и Asn⁴⁴(χ_1). Однако и здесь экспериментальные значения углов χ также приемлемы для найденной структуры; при сохранении других расчетных параметров они приводят к повышению конформационной энергии молекулы лишь на несколько ккалорий. Среднеквадратичные отклонения опытных и теоретических значений двугранных углов вращения вокруг связей основной цепи составляют 13° для ϕ и ψ и 9° для ω . В пределах допустимых экспериментальных ошибок находится также среднеквадратичное отклонение углов χ_1 (18°).

При оценке значимости совпадения вычисленных и опытных значений двугранных углов нужно иметь в виду то обстоятельство, что по ряду причин они не являются удовлетворительными количественными характеристиками пространственного строения белка, найденного теоретическим и экспериментальным путем. Их величины зависят от длин связей и валентных углов молекулы, которые в двух случаях не могли быть идентичны. Так, полученные Дж. Дайзенхофером и У. Стайгеманом [10] при уточнении кристаллической структуры БПТИ по методу Даймонда [13] величины валентных углов $\tau(\text{NC}^\alpha\text{C})$ обнаруживают существенный разброс ($95\text{--}124^\circ$), который не может отвечать реальной ситуации. Приведение углов $\tau(\text{NC}^\alpha\text{C})$ к действительно наблюдаемым у пептидов значениям (интервал $106\text{--}114^\circ$) неминуемо повлечет изменение найденных в работе [10] двугранных углов φ , ψ , ω основной цепи и χ_1 боковых цепей. В нашем расчете была выбрана иная валентная геометрия белковой цепи, основанная на параметрах Полинга для длин связей [14] и усредненных значениях валентных углов пептидной группы [15]. Другая причина неполной корректности сопоставления структур по двугранным углам связана с точностью их расчета. Небольшие ошибки в значениях отдельных двугранных углов, особенно основной цепи, могут привести к значительному изменению всей структуры. Поскольку в расчете они неизбежны, на первый взгляд представляется даже бесперспективным теоретический конформационный анализ белков. На самом деле такое опасение оказалось сильно преувеличенным. Вследствие высокой конформационной чувствительности потенциальной энергии, уникальности трехмерной структуры белка и большой гибкости пептидной цепи на ряде участков аминокислотной последовательности двугранные углы не являются независимыми друг от друга и отклонения расчетных значений одних углов от их истинных величин в той или иной степени компенсируются отклонениями других. Поэтому допускаемые в определении углов погрешности радикальным образом не сказываются на окончательном результате. Однако при сопоставлении их опытных и теоретических значений трудно оценить, насколько серьезно наблюдаемое численное расхождение между ними.

Несмотря на сказанное, имеющее место совпадение двугранных углов основной и боковых цепей, или, иными словами, близость конформационных состояний всех аминокислотных остатков в опытной и теоретической структурах белка, несомненно, является объективным и веским доводом в пользу правильности результатов расчета. Однако лучшее представление о точности априорного расчета трехмерной структуры белка может быть получено из сравнения межатомных расстояний в двух структурах и прежде всего расстояний между C^α -атомами основной цепи. С этой целью найдено среднеквадратичное отклонение всех парных расстояний $\text{C}_i^\alpha \dots \text{C}_j^\alpha$, число которых составило 1540. При сравнении не учтены лишь остатки Gly⁵⁷ и Ala⁵⁸, так как в работе [10] отсутствуют данные об их конформационных состояниях. По-видимому, это связано с подвижностью С-концевого фрагмента Gly⁵⁷–Ala⁵⁸, о чем свидетельствуют и результаты расчета. Найденная величина среднеквадратичного отклонения расстояний между атомами C^α без коррекции на различия в длинах химических связей и

ентных углах составила 1,4 Å; отклонения на участках Arg¹–Cys¹⁴, Cys¹⁴–Cys³⁸ и Cys³⁸–Gly⁵⁶ равны соответственно 1,0; 1,2 и 1,4 Å.

Таким образом, среднеквадратичные отклонения, касающиеся всей структуры молекулы и ее отдельных фрагментов, мало различаются между собой и невелики. Данное обстоятельство свидетельствует о том, что априорный расчет удовлетворительно и примерно с одинаковой точностью предсказывает конформационные состояния отдельных частей молекулы и их взаимное расположение в нативной трехмерной структуре белка. На это указывает также хорошее совпадение габаритных размеров теоретической и экспериментальной конформаций молекулы БПТИ (см. рис. IV.5). Приведем несколько примеров. Так, расчетное и наблюдаемое расстояния C^α₍₁₎...C^α₍₁₅₎ равны 29,1 и 29,8; C^α₍₂₎...C^α₍₅₆₎ – 10,2 и 9,5; C^α₍₈₎...C^α₍₄₂₎ – 11,4 и 10,0; C^α₍₅₅₎...C^α₍₅₎ – 21,1 и 22,0, C^α₍₅₅₎...C^α₍₃₀₎ – 23,3 и 22,3; C^α₍₁₄₎...C^α₍₅₁₎ – 22,3 и 22,1; C^α₍₁₄₎...C^α₍₅₅₎ – 26,3 и 25,3; C^α₍₂₈₎...C^α₍₃₈₎ – 27,5 и 26,0 Å. Правильность полученных в работе [11] результатов подтверждается также сравнением длин водородных связей, обнаруженных в кристаллической и расчетной структурах БПТИ. Данные об их геометрии количественно характеризуют взаимное расположение соответствующих атомных групп, которые принадлежат далеко отстоящим в линейной последовательности остаткам. Среднеквадратичное отклонение длин водородных связей основной цепи равно 0,5 Å. Лишь в двух случаях из 18 различие в расстояниях O...N достигает 1,0 Å. Результаты проведенного сопоставления геометрии двух структур по двугранным углам вращения, расстояниям между атомами C^α и длинам водородных связей позволяют утверждать о хорошем совпадении всех элементов априорно рассчитанной конформации молекулы БПТИ и кристаллической трехмерной структуры белка.

Принципиальная цель расчета трехмерной структуры молекулы трипсинового ингибитора, как и расчета структуры трикозапептидного фрагмента нейротоксина II, заключалась в следующем:

- 1) апробации бифуркационной и физической теорий структурной организации белков;
- 2) выяснении применимости механической модели молекулы к количественному описанию пространственного строения природных полипептидных макромолекул;
- 3) разработке расчетного метода конформационного анализа белков;
- 4) проверке способности потенциальных функций, методов минимизации соответствующих алгоритмов и программ компьютерного счета количественно воспроизводить реальные невалентные взаимодействия атомов белковой молекулы.

Теоретическое рассмотрение структурной организации белков вынуждено было строиться таким образом, что о достижении всех отмеченных целей и решении проблемы можно было судить лишь на завершающей стадии априорного расчета конформации белковой молекулы путем сравнения теоретических результатов с опытными данными. В процессе решения проблемы нельзя было получить однозначный ответ на каждый из поставленных вопросов в отдельности; он всегда носил интегративный

характер и в окончательном виде получался в самом конце длительного, почти не имеющего промежуточного контроля пути – от выяснения конформационных возможностей свободных монопептидов до расчета пространственной структуры всего белка. Поэтому, обнаружив, наконец, удовлетворительное совпадение теоретических и опытных значений конформационных параметров нейтротоксина (см. табл. IV.2) и трипсинового ингибитора (см. табл. IV.14), можно констатировать решение проблемы структурной организации глобулярных белков в принципе. Это самый главный, общий итог всего рассмотрения. Результаты теоретического конформационного анализа двух белков, прежде всего, свидетельствуют о справедливости положенной в основу расчета количественной структурной теории белка, правильном понимании принципов его пространственной организации и о возможности количественного предсказания нативной конформации молекулы исходя только из аминокислотной последовательности. Расчет подтвердил одно из основных положений теории о наличии в плотно упакованной трехмерной структуре белка согласованности между всеми ближними, средними и дальними взаимодействиями. Именно это свойство эволюционно отобранной аминокислотной последовательности ответственно за резкую энергетическую дифференциацию и выделение из множества возможных структурных вариантов стабильной и уникальной в каждом случае глобулярной конформации. В найденной структуре молекулы БПТИ геометрия всех 58 остатков отвечает наиболее предпочтительным конформациям соответствующих свободных монопептидов ($\text{CH}_3\text{-CONH-C}^\alpha\text{RH-CONH-CH}_3$). Ближние взаимодействия определяют конформационные возможности каждого аминокислотного остатка, т.е. набор дозволенных для него конформационных состояний. Средние взаимодействия – взаимодействия остатка с четырьмя предшествующими и четырьмя последующими в цепи остатками – только из этих наборов выбирают конформации, сочетание которых оказывается наиболее выгодным. Суммарный стабилизирующий эффект средних взаимодействий в расчетной конформации молекулы БПТИ составил ~ -180 ккал/моль (в среднем $-3,1$ ккал/моль на остаток). На некоторых участках последовательности белка выбор конформационного состояния остатков только за счет средних взаимодействий практически однозначен (особенно в отношении формы основной цепи). В этих случаях соответствующие фрагменты образуют конформационно стабильные нуклеации. В БПТИ к таким участкам можно отнести $\text{Arg}^1\text{-Pro}^9$, $\text{Phe}^{22}\text{-Gln}^{31}$ и $\text{Ala}^{48}\text{-Gly}^{56}$. В других местах последовательности средние взаимодействия сокращают число возможных конформационных состояний остатков и определяют для соответствующих фрагментов ограниченные наборы приблизительно равновероятных структурных вариантов.

Влияние дальних взаимодействий на конформационно жесткие по средним взаимодействиям фрагменты сводится к их дополнительной стабилизации, а также к еще большему ограничению свободы боковых цепей и, возможно, незначительной корректировке формы основной цепи. У нуклеации фрагмента $\text{Arg}^1\text{-Pro}^9$ энергия средних взаимодействий составляет ~ -35 ккал/моль, а дальних – около -39 ккал/моль; у $\text{Phe}^{22}\text{-Gln}^{31}$ соответствующие величины равны -33 и -34 ккал/моль, а у $\text{Ala}^{48}\text{-Gly}^{56}$ – -36 и

0 ккал/моль. Таким образом, имеет место согласованность между практически равными по своей эффективности невалентными взаимодействиями атомов. По отношению к конформационно лабильным участкам БПТИ функция дальних взаимодействий заключается в выборе из равновероятных по средним взаимодействиям состояний единичных конформаций, обеспечивающих образование между ними и нуклеациями эффективных контактов, а также сближенность комплементарных друг другу микроглобул. Так, расчет показал, что значительно большей подвижностью по сравнению с нуклеациями обладают, например, свободные фрагменты Cys¹⁴-Tyr²¹ и Thr³²-Cys³⁸. Но когда они присоединяются к жесткому по средним взаимодействиям участку Phe²²-Gln³¹, их состояние полностью детерминировано при встраивании в антипараллельную β -структуру и между остатками фрагментов Cys¹⁴-Tyr²¹ и Thr³²-Cys³⁸ образуются эффективные стабилизирующие контакты. Это происходит только в том случае, если каждый из них принимает развернутую форму основной цепи, которая у обоих фрагментов является одной из наиболее выгодных по средним взаимодействиям. Предпочтительность такой формы у Cys¹⁴-Tyr²¹ и Thr³²-Cys³⁸ на белковом участке Cys¹⁴-Cys³⁸ по сравнению с рядом других, изоэнергетичных у свободных фрагментов форм обусловлена дальними взаимодействиями. В β -структуре энергия межостаточных взаимодействий Cys¹⁴-Tyr²¹ с Thr³²-Cys³⁸ составляет ~ -21 ккал/моль, при их собственной энергии в развернутых конформациях соответственно -17 и -15 ккал/моль. Кроме того, они образуют стабилизирующие контакты с предшествующим участком белка Arg¹-Pro¹³ (~ -15 ккал/моль), промежуточным Phe²²-Gln³¹ (~ -5 ккал/моль) и последующим Arg³⁹-Ala⁵⁸ (~ -12 ккал/моль).

Лабилен по средним взаимодействиям также фрагмент Arg³⁹-Ser⁴⁷. Но из большого числа возможных низкоэнергетических конформаций лишь одно его состояние обеспечивает сближенность и образование многочисленных стабилизирующих контактов между жесткими β -структурным (Cys¹⁴-Cys³⁸) и α -спиральным (Ala⁴⁸-Ala⁵⁸) участками белка, суммарный энергетический эффект таких контактов составляет около -22 ккал/моль. Кроме того, в этом конформационном состоянии (энергия его средних взаимодействий равна ~ -25 ккал/моль) сам фрагмент Arg³⁹-Ser⁴⁷ осуществляет одновременно дальние взаимодействия с Arg¹-Pro⁹ (-20 ккал/моль), Cys¹⁴-Cys³⁸ ($-30,0$ ккал/моль) и Ala⁴⁸-Ala⁵⁸ (-25 ккал/моль). Общая энергия дальних взаимодействий в найденной нативной конформации БПТИ равна ~ -120 ккал/моль (в среднем $-2,1$ ккал/моль на остаток). Конформационный анализ молекулы БПТИ показал, что согласованные между собой ближние, средние и дальние взаимодействия отличаются по своей природе и выполняют на разных стадиях самоорганизации белковой структуры определенные функции. Поскольку роль этих взаимодействий различна и в равной мере необходима для осуществления быстрой и безошибочной сборки белка, представляется неоправданным обсуждаемый в литературе вопрос о том, какие взаимодействия (ближние, средние или дальние) имеют определяющее значение в таком процессе. О высокой степени согласованности всех межостаточных взаимодействий свидетельствует тот факт, что у рассмотренных фрагментов БПТИ

независимо от их длины конформационные состояния, входящие в нативную структуру белка, оказывались или глобальными, или самыми предпочтительными; их энергия всегда была много меньше энергии подавляющего большинства конформационных вариантов, отобранных для последующего анализа.

В расчете БПТИ учитывались внутримолекулярные ван-дер-ваальсовы, электростатические и торсионные взаимодействия, а также водородные связи. Каковы же вклады этих взаимодействий в энергию нативной конформации белка? Аминокислотная последовательность БПТИ включает 18 остатков, несущих 12 положительных и 13 отрицательных целочисленных зарядов. Стабилизирующий вклад электростатических взаимодействий заряженных остатков составляет около -50 ккал/моль, а дестабилизирующий — $+35$ ккал/моль. Следовательно, хотя электростатические взаимодействия и понижают конформационную энергию приблизительно на 15 ккал/моль, их интегральный вклад в стабилизацию структуры БПТИ невелик (5%). Суммарный стабилизирующий эффект водородных связей составил около -14 ккал/моль, т.е. $< 5\%$. Обнаруженные в расчете водородные связи обусловлены сложным комплексом многих межостаточных взаимодействий, среди которых собственно водородные связи играют незначительную роль. Общая энергия торсионных взаимодействий в найденной конформации БПТИ равна около $+58$ ккал/моль, т.е. ~ 10 ккал/моль на остаток. Из этого следует, что взаимные расположения практически всех атомных групп основных и боковых цепей аминокислотных остатков отвечают минимумам торсионных потенциалов. Таким образом, доминирующий вклад (75%) в конформационную энергию межостаточных взаимодействий белка вносят ван-дер-ваальсовы, точнее, дисперсионные контакты.

Одним из наиболее интересных и обнадеживающих результатов априорного расчета двух низкомолекулярных белков явилось совпадение почти с экспериментальной точностью значений двугранных углов ϕ , ψ , ω и χ (или координат атомов), рассчитанных и найденных опытным путем. Безусловно, это достойный и эффективный финал длительного исследования. Допуская достаточность и справедливость всех положений использованной структурной теории, применимость для белков механической модели и эффективность разработанного для пептидов расчетного метода, трудно было все-таки надеяться на количественную близость теоретических и экспериментальных данных. Предполагалось, что на окончательных результатах существенным образом скажется ряд условностей в описании невалентных взаимодействий, в учете влияния среды и, видимо, главное, параметризации эмпирических функций. Неизбежным, особенно вначале, представлялось быстро прогрессирующее с увеличением длины цепи накопление ошибок, которое в конечном счете должно было сделать расчет природных полипептидов (даже при правильности всех исходных теоретических посылок) малоэффективным, подобно тому, как пока еще оказывается малоэффективным синтез белков на основе методов органической химии по сравнению с биосинтезом и методами генной инженерии. Почему же этого не произошло в расчете пространственных структур двух рассмотренных белков? Случайно ли получено

Прошнее совпадение теории и опыта или высказанное опасение не является оправданным и пример с искусственным синтезом белков к данному случаю не имеет никакого отношения?

Сомнение в увеличении погрешности расчета по мере усложнения объекта, особенно до размеров белковой макромолекулы, противоречит не только общепринятому мнению, но, казалось бы, здравому смыслу. Хорошо известен факт, что использованные в расчете белков потенциалы приближенны и могут приводить к заметным отклонениям в конформационном анализе даже малых органических молекул. Однако, как и во многих других отношениях, белок и здесь неповторим. Ниже будет показано, что точность расчета пространственной структуры природного полипептида, как это ни парадоксально звучит, практически не определяется длиной аминокислотной последовательности. Это обусловлено механизмом структурной самоорганизации белков. Для молекулы БПТИ он подробно рассматривается в следующем разделе, а сейчас отметим лишь некоторые его особенности общего характера, помогающие ответить на поставленный вопрос о точности расчета.

Формирование нативной конформации белка из неструктурированной флуктуирующей формы неизбежно начинается с выяснения взаимоотношений между соседними по цепи остатками. Конформационные возможности остатков определяются ближними взаимодействиями, т.е. их природой, а конформационные возможности фрагмента – средними взаимодействиями, т.е. конкретной аминокислотной последовательностью. Дальние взаимодействия возникают только на определенной стадии структурирования цепи, уже после того, как средние взаимодействия в основном выполнили свою функцию. Таким образом, самоорганизация белковой глобулы в условиях *in vitro* и *in vivo* – это прежде всего процесс последовательной "минимизации" энергии через выбор конформационных состояний, наиболее предпочтительных сначала для простых, а затем для все более усложняющихся участков вплоть до всей молекулы белка. Сборка белковой цепи по ходу ее рибосомного синтеза и участие шаперонов влияют на скорость процесса, но не затрагивают его статистико-детерминистической природы и специфики бифуркационных флуктуаций, а поэтому не ставят под сомнение зависимость нативной конформации исключительно от аминокислотной последовательности. Ограниченное число возможных для остатков конформационных состояний, образование микроглобул и их ассоциация без существенных изменений конформации при наличии согласованности ближних, средних и дальних взаимодействий значительно упрощают механизм сборки белковой структуры, делают его быстрым и безошибочным. Иерархический, многоступенчатый характер самопроизвольного процесса свертывания полипептидной цепи, в той или иной мере улавливаемый и воспроизводимый расчетом, является главной причиной того, что точность определения конформационных параметров становится малочувствительной к размеру белковой молекулы.

Априорный расчет белка ни на одном из своих этапов, по существу, не сталкивается с независимым определением структуры сложного фрагмента, тем более всей молекулы, из отдельных аминокислотных остатков. Решение всегда ищется через установление пространственных структур

нуклеаций и определение конформационных возможностей промежуточных участков, более лабильных по средним взаимодействиям. Помимо таких, учитываемых в расчете свойств нативной конформации, как плотнейшая упаковка белковой глобулы и согласованность всех внутри- и межостаточных взаимодействий, на точность теоретического анализа оказывают положительное воздействие еще по крайней мере четыре фактора. Во-первых, сравнительно небольшие размеры первичных нуклеационных и конформационно лабильных участков (как правило, 5–10 аминокислотных остатков). Анализ многочисленных олигопептидов, фрагмента 1–23 нейротоксина и молекулы трипсинового ингибитора свидетельствует о том, что погрешности априорного расчета пентадекапептидов отвечают точности рентгеноструктурного анализа белков достаточно высокого разрешения ($\sim 2,0 \text{ \AA}$). Во-вторых, жесткие по средним взаимодействиям нуклеации свободных фрагментов не претерпевают заметных изменений при их включении в состав более сложных участков или всей молекулы. Если при установлении в процессе сборки многочисленных дополнительных контактов с удаленными по цепи остатками структуры нуклеаций сохраняются, то точность расчета геометрии более сложного фрагмента, включающего нуклеации, остается на том же уровне. Этому способствует также третий фактор – высокая чувствительность конформационной энергии к взаимному расположению комплементарных друг другу нуклеаций и промежуточных лабильных фрагментов. В результате расчет нативной трехмерной структуры белка, по существу, сводится к решению блочной задачи – поиску плотнейшей упаковки не отдельных остатков, а жестких фрагментов (блоков) со сложным профилем потенциальной поверхности при вариации известных из анализа ближних и средних взаимодействий конформационных состояний лабильных участков пептидной цепи. Число последних, как правило, невелико. Каждый из них становится также конформационно жестким только при определенной, единственной ориентации относительно комплементарно взаимодействующих между собой нуклеаций. Наконец, в-четвертых, малые погрешности расчета сложных пептидов обусловлены не только согласованностью ближних, средних и дальних взаимодействий, но и согласованностью между собой различных видов взаимодействий – дисперсионных, электростатических, торсионных и водородных связей. Иными словами, самые предпочтительные конформации полипептидов обладают минимальными величинами энергии всех учитываемых в расчете видов невалентных взаимодействий.

Простейший пример – α -спираль, являющаяся структурой, оптимальной с точки зрения дисперсионных взаимодействий атомов основной цепи, пептидных водородных связей ($5 \rightarrow 1$), электростатических взаимодействий и энергии вращения вокруг всех одинарных связей. Только благодаря такой гармонии Полингу и Кори удалось правильно предсказать геометрию α -спирали, сделав в принципе ошибочное предположение о ее стабилизации исключительно за счет водородных связей. На самом же деле главным фактором, цементирующим α -спираль в полярной среде, являются дисперсионные взаимодействия атомов основной цепи, а не пептидные водородные связи. Однако из-за согласованности в этой струк-

туре всех видов взаимодействий ошибочное предположение не сказалось на поиске самой выгодной для основной цепи спиральной структуры с мецелочисленным порядком винтовой оси, но надолго утвердило неправильное представление о природе сил, ее стабилизирующих. Водородные связи типа $5 \rightarrow 1$ сыграли здесь роль геометрического признака α -спирали.

16.3. МЕХАНИЗМ СТРУКТУРНОЙ САМООРГАНИЗАЦИИ

В процессах денатурации и ренатурации аминокислотной последовательности проявляется прямая связь между химическим и пространственным строением молекулы белка. Переход беспорядочно флуктуирующей белковой цепи в детерминированную трехмерную структуру и обратный процесс – переход нативной конформации белка в состояние статистического клубка есть не что иное, как формирование и разрушение тех самых внутриостаточных и межостаточных взаимодействий валентно-несвязанных атомов, теоретическому рассмотрению и априорному расчету которых были посвящены предшествующие главы книги. Очевидно, изучение механизмов денатурации и ренатурации представляется совершенно необходимым для познания принципов структурной организации белковых макромолекул. С другой стороны, любая теоретическая разработка проблемы пространственного строения белков не может считаться завершенной без описания и аргументированной трактовки особенностей уникального процесса свертывания аминокислотной последовательности в высокоорганизованную структуру.

Экспериментальное изучение многих белков, поддающихся ренатурации, выявило наиболее характерные черты этого явления: самопроизвольность протекания, высокую скорость и безошибочность процесса сборки белковой цепи в нативную конформацию. Было показано, что структурная организация белка, несмотря на случайно-поисковый механизм сборки, осуществляется не путем перебора всех возможных конформационных состояний статистического клубка, а по определенному механизму, чувствительному к внешним условиям. При этом не было обнаружено фактов, противоречащих представлению о нативной конформации белковой молекулы как об энергетически глобальном равновесном состоянии.

В результате изучения кинетики ренатурации целого ряда белков стали известны некоторые детали процесса свертывания–развертывания полипептидной цепи. Однако ни в одном случае эта работа не была доведена до логического конца, т.е. до установления конкретного механизма сборки и его количественного структурного, термодинамического и кинетического описания как многоступенчатого, взаимообусловленного на всех своих стадиях процесса. Не получили объяснения побудительные мотивы ренатурации, определяющие скорость процесса и его безошибочность, и, самое главное, возможность спонтанного перераспределения энтропии, т.е. самопроизвольного возникновения порядка из беспорядка. Уже десятки лет прогресс в этой области в теоретическом плане сдерживается из-за отсутствия количественной информации о состоянии и конформационных возможностях белковой цепи на разных стадиях ее самоорганизации и

ориентации при трактовке опытных фактов исключительно на равновесную термодинамику и статистическую физику [16–24].

В экспериментальных исследованиях все еще остаются непреодоленными трудности контроля и управления процессами свертывания, выделения промежуточных метастабильных продуктов и идентификации их структур. В настоящее время лишь для бычьего панкреатического трипсина ингибитора (БПТИ) достаточно полно и на высоком экспериментальном уровне изучен процесс свертывания белковой цепи в условиях *in vitro*. Исследование БПТИ, проведенное Т. Крейтоном [7], относится к самым значительным и глубоким разработкам проблемы ренатурации на фоне аналогичных по направленности экспериментальных исследований других белков. Однако интерпретация опытных данных и здесь носит противоречивый характер и базируется на равновесной термодинамике, в принципе исключающей раскрытие физической сущности ренатурации – явления сугубо неравновесного [25, 26]. Вопрос о движущих силах спонтанного механизма сборки белка даже не обсуждается. Тем не менее благодаря исследованию Крейтона возникла уникальная, качественно новая ситуация, при которой впервые появилась возможность всесторонне проанализировать огромный экспериментальный материал о свертывании белковой цепи БПТИ со строгих теоретических позиций: бифуркационной термодинамической модели (см. разд. 2.1), физической теории структурной организации белка (см. разд. 2.2) и результатов априорного расчета трехмерной структуры БПТИ (см. разд. 16.1 и 16.2). Цель такого совместного рассмотрения конкретных опытных и теоретических данных состоит в получении ответов на следующие вопросы.

1. Какие силы управляют процессом структурной самосборки белковой цепи?

2. Каким образом совершенно беспорядочные и случайные конформационные флуктуации белковой цепи спонтанно вырождаются в строго детерминированный процесс организации трехмерной структуры белка?

3. Почему столь мала продолжительность сборки нативной конформации белка, осуществляемой по беспорядочно-поисковому механизму, единственно возможному в случае самопроизвольно протекающего процесса и, казалось бы, неизбежно связанному с перебором огромного массива конформационных флуктуаций?

Эти вопросы представляют первостепенный интерес для решения проблемы структурной организации белков. Но не только. Они относятся к фундаментальным вопросам всего естествознания, так как являются наиболее общими и принципиальными в изучении неравновесных процессов спонтанного возникновения порядка из хаоса, прежде всего в биосистемах.

Согласно Крейтону [7], процесс ренатурации полностью восстановленной молекулы БПТИ, содержащей остатки цистеина в положениях 5, 14, 30, 38, 51 и 55, начинается с образования S–S-связи с линейным дисульфидным реагентом (гидроксилэтилдисульфидом или окисленным глутатионом). В реакции принимают участие все шесть остатков Cys БПТИ, активность которых практически одинакова и близка активности простых модельных тиолов. Такой экспериментальный факт непосредственно под-

предполагает, что исходным состоянием белковой цепи является флуктуирующий клубок. Об этом же свидетельствует и то обстоятельство, что в самом начале структурирования цепи образуются все в принципе возможные 15 видов промежуточных продуктов с одной внутримолекулярной дисульфидной связью. Таким образом, состояние белковой цепи БПТИ, предшествующее за состоянием беспорядочно флуктуирующего клубка, включает практически полный статистический набор легко переходящих друг в друга моно-SS-продуктов. Дальнейшее развитие событий, как выяснил Сайтон, ведет к дифференциации монодисульфидных производных белка на метастабильности. Через короткое время доминирующими в смеси оказываются лишь два продукта с дисульфидными связями Cys³⁰-Cys⁵¹ (~70%) и Cys⁵-Cys³⁰ (~20%). Это есть первое отклонение от строго статистического распределения в направлении более упорядоченных структур, или, иными словами, появление первых бифуркационных точек на термодинамической кривой процесса. Здесь автор [7] сделал важное наблюдение. Он показал, что образование и содержание двух промежуточных метастабильных состояний с отмеченными единичными S-S-мостиками не зависят от времени ренатурации, природы и концентрации дисульфидного реагента. Следовательно, причина избирательной предпочтительности продуктов с монодисульфидными связями Cys³⁰-Cys⁵¹ и Cys⁵-Cys³⁰ обусловлена внутримолекулярным фактором. Каким же? Эксперимент прямо не отвечает и не может ответить на этот вопрос.

Объяснить возникновение бифуркационных флуктуаций на основе теории равновесных процессов, т.е. полагая все флуктуации термодинамически обратимыми, нельзя. В предложенной мною бифуркационной теории (см. гл. 2) структурирование на любом этапе сборки белка всегда обусловлено неоднородностью беспорядочных конформационных отклонений полипептидной цепи – наличием наряду с множеством обратимых флуктуаций ограниченного числа необратимых, т.е. термодинамически неравновесных флуктуаций. Возникновение тех и других одинаково случайно. Но сам факт существования единственного для каждого белка набора необратимых конформационных флуктуаций не случаен; при соблюдении соответствующих внешних условий их содержание и порядок реализации, несмотря на беспорядочность появления, определяется исключительно аминокислотной последовательностью. Явление свертывания белковой цепи обладает, таким образом, статистико-детерминистической природой. Это принципиальное утверждение. Из него следует, что объективное представление о ренатурации может быть получено только при установлении взаимосвязи между коллективными свойствами белковой макромолекулы и индивидуальными свойствами ее микроскопических составляющих. В силу необратимости этого явления теоретический и методологический аппарат равновесной термодинамики не в состоянии вскрыть физику структурной самоорганизации белка и дать адекватное описание процесса.

Бифуркационная термодинамическая модель, утверждая принципиальную необходимость привлечения необратимых флуктуаций к изучению спонтанной сборки белка, является связующим звеном между статистической и детерминистической физикой. Модель указывает, что даль-

нейший поиск должен быть направлен на выявление причин и условий неизбежного появления необратимых флуктуаций, их идентификацию и установление связи с конкретной аминокислотной последовательностью. Все это задачи физической конформационной теории белков и соответствующего расчетного метода.

Важнейшая особенность белковой цепи, определяющая существование необратимых флуктуаций и, следовательно, возможность спонтанного возникновения высокоорганизованной структуры из хаоса, заключена в специфической конформационной неоднородности природной аминокислотной последовательности. Можно утверждать, что суть рассматриваемого явления состоит в наличии четкой взаимообусловленности между химическим строением, конформационными свойствами и необратимыми флуктуациями. Гетерогенность аминокислотной последовательности ответственна за различие в конформационных возможностях ее отдельных участков, что, в свою очередь порождает термодинамическую неоднородность флуктуаций, дифференциацию их на обратимые равновесные и необратимые неравновесные. Сочетание последних и порядок их следования определяют содержание и направленность механизма быстрой и безошибочной самосборки белковой цепи. Отмеченная связь присуща только эволюционно отобраным аминокислотным последовательностям. В случае же гомогенных, регулярных или даже гетерогенных синтетических полипептидов со случайным порядком аминокислот тот же беспорядочный по своему характеру процесс не имеет развития и не выводит цепь из состояния статистического клубка. Сказанного, однако, недостаточно для объяснения высокой скорости сборки трехмерной структуры белка при его биосинтезе или ренатурации. Чтобы беспорядочно-поисковый механизм мог действительно привести к свертыванию цепи, селекция бифуркационных флуктуаций не должна представлять собой перебор возможных комбинаций всех случайных изменений целой полипептидной цепи, количество которых невероятно велико, и сборка структуры даже такого низкомолекулярного белка, как БПТИ, должна была бы продолжаться не менее 10^{30} лет.

В отношении энергии средних взаимодействий все участки белковой цепи можно четко разделить на две группы. В первую входят конформационно жесткие фрагменты, пространственное строение которых практически полностью определяется взаимодействиями входящих в них остатков. Вторая группа включает конформационно лабильные фрагменты цепи. Свою окончательную пространственную форму они обретают (иногда не до конца) после реализации не только средних межостаточных взаимодействий, но и дальних. Расчеты большого числа сложных природных олигопептидов (см. гл. 8–14), фрагмента Leu¹–Cys²³ нейротоксина II и БПТИ (см. гл. 15, 16) обнаружили в организации их пространственных структур следующие характерные черты, по-видимому, общие для эволюционных аминокислотных последовательностей.

1. Конформационные возможности всех фрагментов белковой цепи определяются исключительно природой и порядком расположения аминокислотных остатков.

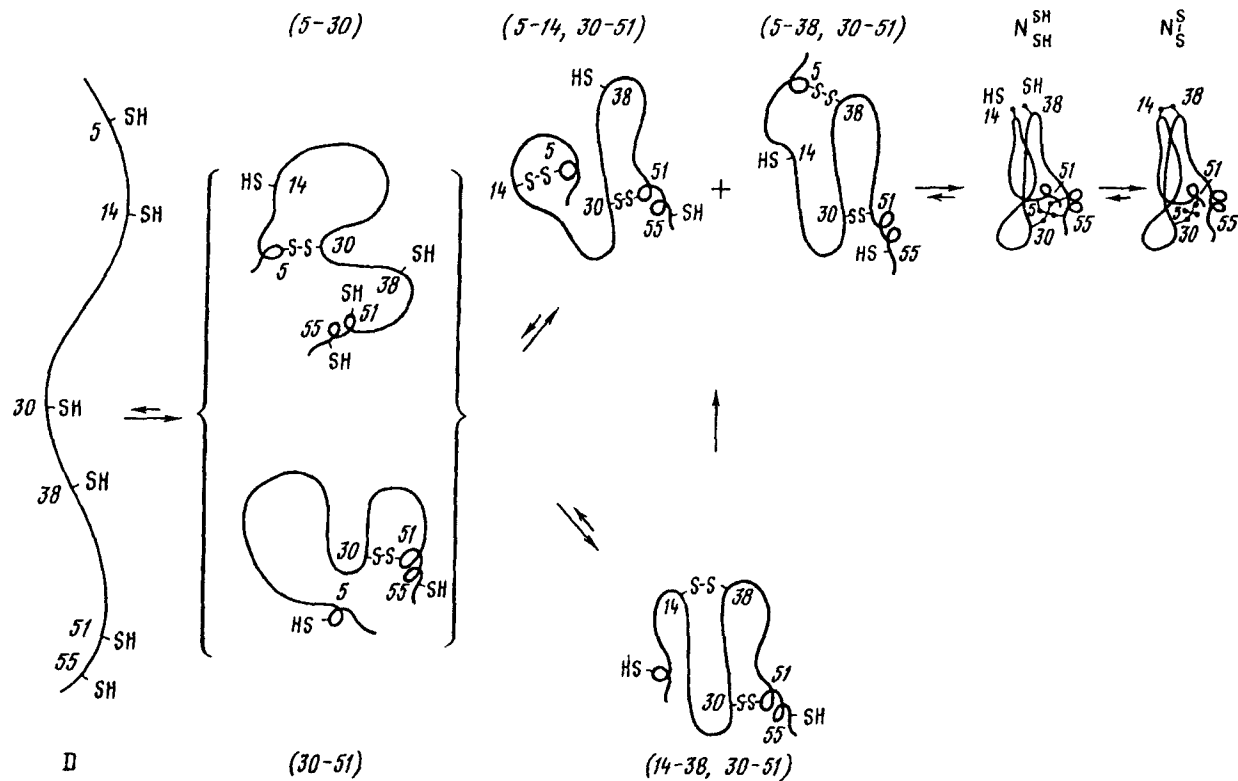
2. Конформационно жесткие и лабильные по средним взаимодействиям

фрагменты альтернируют вдоль полипептидной цепи белка и в начальной стадии свертывания практически независимы друг от друга.

3. Первичные конформационно жесткие и лабильные фрагменты невелики и включают ~10 аминокислотных остатков.

Эти особенности природных полипептидов, как будет подтверждено совместным рассмотрением опытных данных Крейтона и результатов расчета конформационных возможностей БПТИ, оказываются достаточными для сокращения области поиска и направления случайного возникающих флуктуаций по кратчайшему пути. Сборка белка при соблюдении отмеченных условий начинается одновременно и практически независимо на конформационно жестких по средним взаимодействиям фрагментах, разделенных лабильными участками последовательности. Случайный и беспорядочный перебор всех возможных флуктуаций практически автономных жестких фрагментов обязательно приведет к возникновению у каждого из них бифуркационной комбинации необратимых конформационных изменений, отвечающих уникальному сочетанию флуктуаций входящих в фрагмент остатков. Время, необходимое для структурной самоорганизации пептидного участка из n остатков по беспорядочно-поисковому механизму $t = 10^{n-14}$ с. Следовательно, продолжительность сборки конформационно жесткого фрагмента с $n < 12$ не превышает 10^{-2} с, т.е. вполне реально. Альтернирующие вдоль белковой цепи конформационно лабильные участки приблизительно той же длины за это время также претерпевают серьезные изменения. Реализация у них средних взаимодействий приводит к ограничению конформационной свободы. Из огромного массива случайных состояний путем все того же беспорядочного перебора обратимых и необратимых флуктуаций за время $t = 10^{n-14}$ с возникает ограниченный набор устойчивых и при отсутствии дальних взаимодействий изоэнергетических состояний.

Вернемся теперь к ренатурации молекулы БПТИ. Обнаруженная Крейтоном [7] в самом начале этого процесса статистическая смесь моно-SS-продуктов может быть смело отнесена к добифуркационному этапу сборки, когда еще не сложились автономные конформационно жесткие структуры и состояние белковой цепи почти полностью определялось обратимыми флуктуациями. Через короткое время селекция беспорядочных конформационных отклонений привела к возникновению на участках Arg¹-Pro⁹ (см. рис. IV.7), Phe²²-Gln³¹ (см. табл. IV.7) и Ala⁴⁸-Gly⁵⁶ стабильных пространственных форм, а на промежуточных участках последовательности БПТИ к немногочисленным наборам структурных вариантов. После уменьшения конформационной свободы продукты с одной дисульфидной связью в денатурированной цепи уже не могут оставаться равновероятными. Существовавшая ранее статистическая смесь 15 моно-SS-продуктов автоматически дифференцируется по энергии. В результате, как показывает опыт, наиболее предпочтительными оказываются два продукта. Один из них содержит связь Cys³⁰-Cys⁵¹, а другой – Cys⁵-Cys³⁰, отсутствующую в нативной конформации белка (рис. IV.17). Интересно то обстоятельство, что остатки Cys⁵, Cys³⁰ и Cys⁵¹, образующие дисульфидные связи в самых предпочтительных моно-SS-производных, входят в конформационно жесткие фрагменты 1-9, 22-31 и



Р и с. IV.17. Схема механизма ренатурации и денатурации полипептидной цепи молекулы БПТИ

48-56. Это, по-видимому, не случайно, поскольку большую вероятность оказаться сближенными имеют остатки Cys, обладающие меньшим числом степеней свободы, т.е. принадлежащие жестким структурам.

На следующем этапе происходит образование ди-SS-продуктов. Здесь проявляется взаимообусловленность между конформационными состояниями значительно большего количества звеньев полипептидной цепи; к структурированию начинают подключаться дальние взаимодействия. Рост длины белковых участков, беспорядочная флуктуация которых в конечном счете приводит к созданию новых конформационных состояний, существенным образом, однако, не может сказаться на продолжительности случайного поиска бифуркационных флуктуаций этого этапа сборки. Одновременно с увеличением размеров свертывающихся пептидных участков резко сокращается число их конформационных степеней свободы. Из первоначального массива переменных денатурированной цепи БПТИ исключается подавляющее большинство параметров конформационно жестких участков 1-9, 22-31 и 48-56, а также заметно ограничиваются области допустимых изменений параметров промежуточных лабильных участков.

Второй шаг неравновесного процесса свертывания белковой цепи делается, как и первый шаг, путем беспорядочных флуктуаций, но на более узком базисе случайных изменений. Он приводит к появлению трех метастабильных ди-SS-продуктов, которые содержат дисульфидную связь Cys³⁰-Cys⁵¹ нативной конформации БПТИ (см. рис. IV.17). Вторые же связи S-S ("неправильные" Cys⁵-Cys¹⁴, Cys⁵-Cys³⁸ и "правильная" Cys¹⁴-Cys³⁸) у всех производных оказались неустойчивыми. Обнаруженный Крейтоном факт спонтанного образования сразу трех метастабильных ди-SS-продуктов, ни один из которых не отвечает кратчайшему пути свертывания белковой цепи и впоследствии не избегает частичного деструктурирования, парадоксален с точки зрения равновесной термодинамики и теории Брандтса [17]. В то же время этот факт легко находит свое объяснение в рамках неравновесной, бифуркационной модели с привлечением результатов априорного расчета трехмерной структуры белковой молекулы. Одновременное образование трех дисульфидных производных обусловлено действием двух факторов. Во-первых, случайностью возникновения необратимых флуктуаций, которые именно в силу этого обстоятельства не могут появляться одновременно сразу у всех ренатурирующихся молекул белка. Во-вторых, неслучайным, определяемым данной аминокислотной последовательностью характером необратимых флуктуаций, комбинации которых приводят к созданию специфических метастабильных, не в полной мере энергетически эквивалентных конформационных состояний. Конкретная ситуация, возникающая в момент сборки белка, отражает соотношение уровней развития статистической и детерминистической тенденций в механизме ренатурации. Результирующий эффект этапа свертывания белковой цепи зависит от того, в какой мере оказываются согласованными между собой случайно возникшие конформационные отклонения и сложившаяся к этому моменту пространственная структура белковой цепи. Так, у БПТИ реализующиеся системы дисульфидных связей в ди-SS-продуктах отражают три различных состояния

сборки антипараллельной α -структуры и строго соответствующие им три различных вида неравновесных флуктуаций.

Расчет показал, что конформационно лабильные по средним взаимодействиям участки $\text{Pro}^9\text{--Cys}^{14}$ и $\text{Cys}^{38}\text{--Ala}^{48}$ обретают свои окончательные пространственные формы только по завершении сборки β -структуры $\text{Cys}^{14}\text{--Cys}^{38}$, которая служит для их укладки матрицей, обеспечивающей образование многочисленных стабилизирующих контактов между удаленными по цепи остатками. Наличие у одного из ди-SS-продуктов дисульфидной связи $\text{Cys}^5\text{--Cys}^{14}$ отвечает самой ранней стадии формирования β -структуры, когда фрагмент $\text{Arg}^1\text{--Cys}^{14}$ еще лишен дальних взаимодействий с последующими остатками и является практически свободным. Как показал расчет (см. табл. IV.5 и рис. IV.9), наиболее низкой энергией в этом случае обладает конформация фрагмента со сближенными боковыми цепями Cys^5 и Cys^{14} , отличающаяся от нативного состояния только значением угла ψ остатка Pro^{10} . Возникающее в период зарождения β -структуры случайное отклонение, сближающее 5-й и 14-й остатки Cys , оказывается самой предпочтительной по энергии, или, иными словами, неравновесной бифуркационной флуктуацией. Это отклонение станет невозможным или потеряет свою актуальность, будет высокоэнергетичным и обратимым, если оно появится позднее, в середине или в конце процесса формообразования β -структуры. Статус бифуркационной флуктуации приобретет другое конформационное отклонение, сближающее остатки Cys^5 и Cys^{38} . Как следует из расчета [11], образование дисульфидной связи $\text{Cys}^5\text{--Cys}^{38}$ в ситуации, близкой к стадии полного завершения β -структуры, также реально и энергетически выгодно. Сближенность остатков Cys^5 и Cys^{38} достигается в конформации фрагмента $\text{Arg}^1\text{--Cys}^{38}$, отличающейся от его состояния в нативной структуре белка значением лишь одного двугранного угла ϕ остатка Gly^{36} .

Сборку β -структуры венчает образование дисульфидной связи $\text{Cys}^{14}\text{--Cys}^{38}$, которая вместе со связью $\text{Cys}^{30}\text{--Cys}^{51}$ обнаруживается в третьем ди-SS-продукте. Но что удивительно, оба S-S-мостика, являясь правильными, не делают данное метастабильное состояние прямым промежуточным продуктом на пути к нативной трехмерной структуре белка. Т. Крейтон показал, что еще на стадии образования моно-SS-продуктов свободная сульфгидрильная группа остатка Cys^{55} предпочитает реагировать не с группой SH остатка Cys^5 , а с линейным дисульфидным реагентом RSSR, образуя производное с S-S-мостиком $\text{Cys}^5\text{--SR}$. В результате накапливаются продукты $(\text{Cys}^{30}\text{--Cys}^{51}, \text{Cys}^{55}\text{--SR})$ и $(\text{Cys}^{14}\text{--Cys}^{38}, \text{Cys}^{30}\text{--Cys}^{51}, \text{Cys}^{55}\text{--SR})$, которые исключают участие остатка Cys^{55} в образовании как второй, так и третьей белковой связи S-S, завершающей создание системы дисульфидных мостиков БПТИ. Промежуточный продукт $(\text{Cys}^{14}\text{--Cys}^{38}, \text{Cys}^{30}\text{--Cys}^{51})$, казалось бы, ближе всего подошедший к нативной конформации БПТИ, удаляется от нее и переходит в два других ди-SS-продукта, содержащих по одной неправильной дисульфидной связи (см. рис. IV.17). Однако метастабильные состояния $(\text{Cys}^5\text{--Cys}^{14}, \text{Cys}^{30}\text{--Cys}^{51})$ и $(\text{Cys}^5\text{--Cys}^{38}, \text{Cys}^{30}\text{--Cys}^{51})$ также неустойчивы и быстро восстанавливаются до моно-SS-продукта $(\text{Cys}^{30}\text{--Cys}^{51})$, т.е. продукта, который уже существовал в начале свертывания. Совершен холостой оборот и процесс

нулся "на круги своя"? Последующие события показывают, что нет. Моно-SS-продукт ($\text{Cys}^{30}\text{--Cys}^{51}$), образовавшийся в конце второй стадии ренатурации из трех ди-SS-продуктов, в отличие от продукта с тем же дисульфидным мостиком первой стадии наделен способностью переходить в ди-SS-метастабильное состояние с двумя нативными связями $\text{Cys}^5\text{--Cys}^{55}$ и $\text{Cys}^{30}\text{--Cys}^{51}$, к которым вскоре присоединяется третья связь $\text{Cys}^{14}\text{--Cys}^{38}$. Таким образом, свертывание полипептидной цепи БПТИ как будто бы отвечает элементарным требованиям, которым должен удовлетворять сложный процесс, чтобы быть надежным и быстрым. Наблюдаемый механизм сборки белка, на первый взгляд, представляется недостаточно последовательным, усложненным излишне большим количеством прямо не связанных ни с начальным, ни с конечным состоянием промежуточных продуктов и, следовательно, перегруженным многочисленными переходами между ними. Чтобы понять неизбежность и необходимость всего этого, что совершается самопроизвольно в реальном процессе организации трехмерной структуры БПТИ, требуется ответить на следующие конкретные вопросы.

1. Почему ди-SS-продукт ($\text{Cys}^5\text{--Cys}^{55}$, $\text{Cys}^{30}\text{--Cys}^{51}$) не мог быть образован сразу же из первоначального монодисульфидного производного со связью $\text{Cys}^{30}\text{--Cys}^{51}$? Чем вызвано превращение моно-SS-производного ($\text{Cys}^{30}\text{--Cys}^{51}$) в различные ди-SS-продукты, их последующее разрушение с повторным возвращением к тому же монопроизводному?

2. В чем причина максимальной устойчивости у моно- и ди-SS-метастабильных промежуточных состояний дисульфидной связи $\text{Cys}^{30}\text{--Cys}^{51}$?

3. Почему не могла быть реализована еще одна возможность в выборе более короткого пути свертывания через прямой перевод ди-SS-продукта ($\text{Cys}^{14}\text{--Cys}^{38}$, $\text{Cys}^{30}\text{--Cys}^{51}$) в нативную трехмерную структуру белка путем образования третьей дисульфидной связи $\text{Cys}^5\text{--Cys}^{55}$?

Перед тем как ответить на эти вопросы и приблизиться к пониманию действительного механизма свертывания полипептидной цепи БПТИ, напомним некоторые особенности рассматриваемого явления ренатурации в свете предположенной неравновесной термодинамической теории и физической теории структурной самоорганизации белков. Во-первых, все события, совершающиеся в процессе свертывания полипептидной цепи белковой молекулы, являются беспорядочными; возникновение как обратимых, так и необратимых флуктуаций имеет исключительно случайный характер. Во-вторых, флуктуации тем более необратимы, чем ближе они подводят пространственное строение фрагментов белковой цепи к конформационным состояниям, реализующимся в нативной структуре молекулы. В-третьих, появление актуальных для каждой стадии свертывания белка необратимых флуктуаций всегда неизбежно и своевременно.

Механизм структурной самоорганизации белка – это спонтанная трансформация случайных конформационных отклонений в строго направленную и детерминирующую процесс последовательность событий. Автоматизм процесса гарантирован возможностью осуществления на любой стадии сборки белка перебора всех комбинаций случайных флуктуаций, включающих необратимые, бифуркационные флуктуации. В самом начале ренатурации механизм свертывания полипептидной цепи представляет

с собой, по существу, аддитивную сумму нескольких процессов, возникающих одновременно и идущих параллельно, практически независимо друг от друга на нескольких участках. Каждый из них включает сборку небольшого (~10 остатков) олигопептидного фрагмента в конформационно жесткую нуклеацию. Как уже отмечалось, беспорядочно-поисковый механизм здесь по продолжительности вполне приемлем и неизбежно приведет к возникновению бифуркационной комбинации необратимых флуктуаций. По ходу дальнейшей сборки во взаимодействия вовлекается все большее число остатков, что, однако, не снижает скорость процесса и не ставит под сомнение реальность беспорядочного перебора случайных отклонений. Включение дальних взаимодействий сопровождается резким сокращением конформационных степеней свободы и количества возможных флуктуаций. С течением процесса вероятность возникновения необратимых флуктуаций возрастает, достигая максимума в самом конце сборки.

При рассмотрении механизма ренатурации БПТИ состояние белковой цепи на пути от статистического клубка к нативной конформации оценивалось, следуя Крейтону [7], по дисульфидным связям (см. рис. IV.17). Считалось, что чем больше их число и чем ближе они подходят к системе дисульфидных связей конечной структуры, тем дальше продвинулся процесс сборки. При экспериментальном изучении ренатурации белков альтернативного, столь же надежного способа идентификации структуры промежуточных метастабильных состояний практически нет. Действительно, дисульфидная связь является удобным критерием. Она указывает на сближенность определенных участков белковой цепи на этапах свертывания, надежно характеризует как исходное, полностью денатурированное состояние, так и конечную, нативную трехмерную структуру. И тем не менее способ идентификации промежуточных состояний только по дисульфидным связям не может пролить свет на многие важные детали механизма ренатурации и ответить на поставленные вопросы. Возникновение этих связей является следствием, а не причиной самоорганизации белковой цепи.

По дисульфидному признаку неразличимы, например, два моно-SS-продукта с мостиком $\text{Cys}^{30}\text{--Cys}^{51}$, один из которых возникает в самом начале свертывания из статистического клубка, а второй – в конце сборки, после частичной деструкции ди-SS-продуктов ($\text{Cys}^5\text{--Cys}^{14}$, $\text{Cys}^{30}\text{--Cys}^{51}$) и ($\text{Cys}^5\text{--Cys}^{38}$, $\text{Cys}^{30}\text{--Cys}^{51}$). На самом же деле конформационные состояния двух моно-SS-продуктов с дисульфидной связью $\text{Cys}^{30}\text{--Cys}^{51}$ имеют мало общего между собой. В первом производном в лучшем случае близки к завершению структуры конформационно жестких по средним взаимодействиям нуклеаций $\text{Arg}^1\text{--Pro}^9$, $\text{Phe}^{22}\text{--Gln}^{31}$ и $\text{Ala}^{48}\text{--Gly}^{56}$. Его переход к ди-SS-производному ($\text{Cys}^5\text{--Cys}^{55}$, $\text{Cys}^{30}\text{--Cys}^{51}$) или ($\text{Cys}^{14}\text{--Cys}^{38}$, $\text{Cys}^{30}\text{--Cys}^{51}$) маловероятен по двум причинам. Во-первых, из-за сохранившегося у белковой цепи на этой стадии сборки большого количества степеней свободы, допускающих реализацию множества конформационных состояний лабильных участков, разделяющих нуклеации. Беспорядочный перебор всех случайных отклонений и селекция необратимых флуктуаций требуют пока длительного времени. Но это даже не самое важное. Главная причина невозможности образования на стадии сборки связи $\text{Cys}^5\text{--Cys}^{55}$

ли Cys¹⁴–Cys³⁸) заключается в отсутствии у первого моно-SS-продукта условий, необходимых для превращения соответствующих конформационных отклонений в необратимые. Для появления бифуркационных комбинаций неравновесных флуктуаций нужно, чтобы случайные отклонения вели к созданию самых предпочтительных по энергии структур, имеющих наибольшее число стабилизирующих межостаточных контактов. Расчет конформационных возможностей всех участков белковой цепи БПТИ, однако, показал, что возникновение актуальных для сближенности остатков Cys⁵ и Cys⁵⁵ и образования между ними S–S-мостика энергетически выгодных конформационных отклонений можно ожидать лишь на заключительной стадии построения β -структуры. В работе [11] показано, что эта структура при сборке БПТИ служит матрицей для укладки лабильных участков как со стороны N-конца, так и со стороны C-конца белковой цепи.

Необратимые флуктуации, возникающие в белковой цепи до окончания сборки β -структуры, приводят к образованию вторых дисульфидных связей между Cys⁵ и Cys¹⁴, Cys⁵ и Cys³⁸ (см. рис. IV.17). Независимый расчет подтвердил, что конформации получающихся при этом ди-SS-продуктов обладают на соответствующих этапах ренатурации минимальной энергией и включают в основном состояния остатков нативной структуры. Таким образом, после появления нуклеаций Arg¹–Pro⁹, Phe²²–Gln³¹, Ala⁴⁸–Ile⁵⁶ и образования дисульфидной связи Cys³⁰–Cys⁵¹ создаются стерические условия, благоприятные для появления необратимых флуктуаций, ведущих сначала к ди-SS-продукту (Cys⁵–Cys¹⁴, Cys³⁰–Cys⁵¹), а затем – (Cys⁵–Cys³⁸, Cys³⁰–Cys⁵¹). Предпочтительность обоих ди-SS-продуктов носит, однако, временный характер и приведшие к ним флуктуации кажутся псевдонеобратимыми. По мере структурирования цепи энергия конформационных состояний локальных участков с дисульфидными связями Cys⁵–Cys¹⁴ и Cys⁵–Cys³⁸ возрастает, поскольку, как показал расчет, они препятствуют образованию многочисленных дальних контактов. Наличие же у продуктов второй дисульфидной связи Cys³⁰–Cys⁵¹, напротив, способствует ренатурации белка, сближая его C-конец с β -структурой и конформационно жестким N-концевым фрагментом Arg¹–Pro⁹. Поэтому в результате развития процесса свертывания цепи дестабилизируются связи Cys⁵–Cys¹⁴ и Cys⁵–Cys³⁸ и стабилизируется связь Cys³⁰–Cys⁵¹.

После завершения построения β -структуры возникает третий ди-SS-продукт с двумя нативными дисульфидными связями Cys¹⁴–Cys³⁸ и Cys³⁰–Cys⁵¹. Он отличается излишней конформационной жесткостью, которая не позволяет преодолеть серьезные стерические ограничения на пути к сближению N- и C-концевых участков белка и созданию третьей нативной дисульфидной связи Cys⁵–Cys⁵⁵. Иными словами, здесь не возникают соответствующие неравновесные флуктуации, ведущие к низкоэнергетической сближенности боковых цепей остатков Cys⁵ и Cys⁵⁵. Процесс ренатурации БПТИ, как свидетельствует эксперимент Крейтона, развивается через повторное создание моно-SS-производного с дисульфидной связью Cys³⁰–Cys⁵¹ из нестабильных ди-SS-продуктов. Однако его конформационное состояние отлично от состояния моно-SS-производного,

образующегося в самом начале свертывания белка. Если структура раннего моно-SS-продукта в большой мере отвечает статистическому клубку, то структура второго продукта с той же дисульфидной связью – нативной конформации белка. В ней в уже завершенном виде присутствует β -структура, около которой в основном находятся лабильные по средним взаимодействиям участки (сначала $\text{Pro}^9\text{--Cys}^{14}$, затем $\text{Cys}^{38}\text{--Ala}^{48}$), что автоматически приводит к сближению остатки Cys^5 и Cys^{55} . По-видимому, отсутствие у этого продукта мостика $\text{Cys}^{14}\text{--Cys}^{38}$ оставляет свободу, необходимую и достаточную для конформационных изменений, сопутствующих образованию дисульфидной связи $\text{Cys}^5\text{--Cys}^{55}$. Пространственное строение ди-SS-продукта ($\text{Cys}^5\text{--Cys}^{55}$, $\text{Cys}^{30}\text{--Cys}^{51}$) не отличается от строения нативного белка с восстановленной связью $\text{Cys}^{14}\text{--Cys}^{38}$ ($\text{N}_{\text{SH}}^{\text{SH}}$) (см. рис. IV.17). Т. Крейтон показал, что среди всех ди-SS-метастабильных производных это промежуточное состояние является наиболее стабильным. Свой обратный переход оно совершает очень медленно с периодом полураспада около 10 ч. В то же время образование третьей дисульфидной связи и обращение в нативное состояние требует всего 12 мкс.

Итак, завершено рассмотрение опытных данных Крейтона о механизме сборки трипсинового ингибитора. Оно основывалось на неравновесной термодинамической модели, физической теории структурной самоорганизации и конкретных результатах априорного расчета конформационных возможностей полипептидной цепи и геометрии нативной трехмерной структуры белка. Общим итогом анализа является адекватное естественному процессу ренатурации представление всего пути свертывания белка – от состояния статистического клубка до строго детерминированной нативной конформации макромолекулы. К принципиальным результатам рассмотрения следует, по-видимому, отнести выявление причин и количественное теоретическое обоснование возможности спонтанной, быстрой и безошибочной сборки флуктуирующей беспорядочным образом белковой цепи.

Глава 17

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ПРОБЛЕМЕ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКА

В предыдущих главах обсуждены результаты первых и пока единственных априорных расчетов трехмерных структур двух низкомолекулярных белков – нейротоксина II и панкреатического трипсинового ингибитора. Они демонстрируют возможность количественного подхода к описанию на атомном уровне нативной конформации и механизма структурной самоорганизации белковой молекулы, руководствуясь только знанием аминокислотной последовательности. Совпадение найденных теоретически и полученных экспериментально значений двугранных углов ϕ , ψ , ω и χ с

точностью рентгеноструктурного анализа белков достаточно высокого разрешения ($\sim 2,0 \text{ \AA}$) показало справедливость бифуркационной теории свертывания и физической теории структурной организации белковых молекул. Были также выявлены большие потенциальные возможности разработанного на основе этих теорий специального метода конформационного анализа природных полипептидов. В настоящей главе рассмотрены существующие альтернативные теоретические подходы к достижению тех же целей – предсказанию трехмерной структуры белка и механизма автоматического воспроизведения сборки белковой цепи. Изложение этой темы было начато во втором томе монографии "Проблема белка"; частично она затрагивается в главах 2 и 7 данного тома. Здесь обсуждаются теоретические аспекты структурной организации белка, тенденции развития и перспективы.

В течение последних трех десятилетий проведено не менее двух тысяч теоретических исследований пространственного строения белков и предложено около сотни различных методов конформационного анализа, причем более половины в конце 1980-х и первой половине 1990-х годов [27, 28]. Однако, несмотря на все возрастающую интенсивность поиска, ни одна из попыток не привела к желаемой цели. Камнем преткновения во всех случаях являлась так и оставшаяся непреодоленной проблема множественности минимумов на потенциальной поверхности белка или, иными словами, проблема выбора из практически беспрельдельного количества равновероятных конформационных состояний единственной пространственной структуры, обладающей самой низкой энергией. О трудности решения этой проблемы говорит хотя бы тот факт, что при современной вычислительной технике расчет всех мыслимых структурных вариантов за приемлемое время может быть осуществлен лишь для пептида, состоящего не более чем из 4–6 аминокислотных остатков (из 3–5 остатков – двадцать лет назад). Выход из тупиковой ситуации пытаются найти в методологическом, математическом и алгоритмическом совершенствовании конформационных моделей, направленном на уменьшение набора исходных для минимизации приближений и сокращение времени счета, оставляя при этом неизменными теоретические основы поиска. По методологическому признаку выполненные исследования структуры белков можно разделить до некоторой степени условно на три группы. К первой группе следует отнести работы, использующие упрощенные модели белковой цепи. Вторую группу составляют исследования, в которых привлекаются эмпирические корреляции. В работах третьей группы поиск решения проблемы ведется с использованием прямой или косвенной информации о геометрии нативной конформации изучаемого белка или его гомологов.

Объединяет авторов исследований трех групп непоколебимая вера в существование проблемы множественности (см. разд. 7.3), убежденность в том, что она адекватно передает реальный процесс свертывания белковой цепи и не может не возникнуть при изучении беспорядочно-поискового механизма сборки. Отсюда стремление решить эту проблему или, в крайнем случае, обойти ее. Однако есть все основания полагать, что проблема множественности в том виде, в каком она обычно формулируется, вообще

не существует. Она не отражает действительную ситуацию, поскольку для перехода флуктуирующей белковой цепи в нативную конформацию не требуется перебор всех конформационных состояний, отвечающих в принципе возможным локальным минимумам энергии. Если бы такой перебор был необходим, то не могла бы сложиться трехмерная структура ни у одной аминокислотной последовательности. Поэтому все попытки как-то упростить задачу поиска глобальной конформации белка, не отказываясь при этом от самой проблемы множественности, т.е. не признав ее псевдопроблемой, представляются обреченными на неудачу. Кроме того, невозможно исследовать природу сугубо нелинейного неравновесного процесса спонтанного возникновения порядка из хаоса и пытаться количественно описать его статистико-детерминистический механизм, выбрав в качестве теоретической основы равновесную термодинамику и формальную кинетику. Таким образом, на сегодняшний день существуют два альтернативных по своему отношению к проблеме множественности направления в развитии теоретического конформационного анализа пептидов и белков. Авторы рассматриваемых ниже исследований исходят из наличия такой проблемы, автор настоящей книги – из ее отсутствия.

17.1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ

Первая попытка воспроизвести свертывание белковой цепи с помощью упрощенной модели аминокислотной последовательности была предпринята в 1975 г. М. Левиттом и А. Уоршелом [29, 30]. Авторы представили белковую цепь в виде последовательности, в которой каждый остаток аппроксимирован двумя центрами: атомом C^α и боковой цепью в виде сферы с радиусом, равным среднему радиусу вращения соответствующей атомной группы. Предполагалось, что взаимодействия возможны только между сферами боковых цепей, а атомы C^α определяют лишь контур пептидного остова. В такой бусиничной с шаровыми подвесками модели остаток имеет только одну степень свободы – торсионный угол вращения относительно виртуальной связи, соединяющей два соседних атома $C^\alpha(\alpha_i)$. Со столь упрощенным описанием геометрии белковой цепи соизмерим и учет внутримолекулярных невалентных взаимодействий. При расчете энергии предполагалось, что белковая цепь состоит не из 20 различных аминокислотных остатков, а всего только из трех: Ala, Gly и Pro. Потенциалы вращения вокруг виртуальных связей $C^\alpha-C^\alpha$ были получены путем усреднения энергии по всем конфигурациям дипептидов Ala-Ala, Ala-Gly, Ala-Pro, Gly-Gly, Gly-Ala и Pro-Ala, предполагая их зависимость исключительно от природы второй аминокислоты. Для остатков Asp и Asn использован потенциал, найденный для Gly, а для других остатков, кроме Pro, – потенциал Ala. Выбор одинаковых потенциалов для Asp, Asn и Gly обоснован тем обстоятельством, что эти остатки часто встречаются в β -изгибах основной цепи. Таков же уровень обоснования других приближений.

Эффективные потенциалы взаимодействия между двумя одноименными боковыми цепями Ala и Pro рассчитывались по функции типа Леннарда-

Джонса как сумма энергии взаимодействий всех атомов в одной сфере с атомами в другой. Потенциалы взаимодействий между разноименными боковыми цепями получены с помощью среднегеометрического комбинационного правила. Свертывание модели определялось путем решения уравнений молекулярной динамики, а влияние на этот процесс окружающей среды учитывалось введением специальной энергетической составляющей гидрофобных взаимодействий. Последние оценивались по данным растворимости аминокислот в воде и этаноле. Описанный подход опробован Левиттом и Уоршелом в расчете трехмерной структуры бычьего панкреатического трипсинавого ингибитора [29]. Белок, состоящий из ~900 атомов и имеющий 319 конформационных степеней свободы (углы вращения ϕ , ψ , ω и χ) был представлен бусиничной моделью из 110 обобщенных "атомов" с 57 степенями свободы (углы α). Для минимизации энергии такой системы при вариации углов α выбраны следующие три варианта начальных приближений: полностью собранная нативная конформация белка, развернутая цепь с фиксированным С-концевым α -спиральным фрагментом (остатки 48–58) и полностью развернутая цепь. Наиболее предпочтительные оптимальные конформации каждого из трех начальных приближений имели среднестатистические отклонения от кристаллической структуры белка – 2,5, 6,2, и 7,8 Å. Минимизация энергии полностью развернутой цепи второго и третьего исходных структурных вариантов не привела к появлению каких-либо элементов нативной конформации белка; конечный результат целиком определялся начальным приближением. Выбранная модель, таким образом, не сработала.

В другой работе этих же авторов [31] исследована трехмерная структура миогена карпа (180 аминокислотных остатков). Использовалась та же расчетная модель с максимально упрощенными представлениями полипептидной цепи и силового поля. Вопрос о свертывании белка из полностью развернутой цепи уже не ставился; все исходные для минимизации приближения содержали шесть α -спиральных сегментов, наблюдаемых в кристаллической структуре миогена. Компьютерное воспроизведение упаковки заданных вторичных структур выполнено при трех условиях. В первом случае рассматривалось взаимодействие лишь пары α -спиралей. Было показано, что они предрасположены к достижению оптимального взаимодействия. Во втором случае аналогичная задача ставилась для четырех α -спиралей (69 остатков). Однако она оказалась практически нерешаемой; было получено пять конформаций со среднестатистической ошибкой ~7,0 Å. В третьем случае моделировалось свертывание белковой цепи миогена из шести жестких цилиндров. После длительных поисков были найдены три структуры с ошибкой в 8,5 Å.

Много общего с методом М. Левитта и А. Уоршела имеет метод расчета укладки трехмерной структуры белка, предложенный И. Кунтцем и соавт. [32]. В данном случае белковая цепь представлялась последовательностью сфер, центры которых совмещены в атомами C^α . Радиус каждой сферы грубо эквивалентен ван-дер-ваальсову радиусу боковой цепи. В качестве независимых переменных выбраны $3n$ декартовых координат центров сфер (n – число аминокислотных остатков в белке). На свободу остатков в такой бусиничной (без подвесок) модели наложена

система ограничений. Остатки могут подходить друг к другу только до определенного расстояния. Между ними имеются взаимодействия, повышающие или понижающие энергию. Гидрофобные остатки должны находиться не более чем на $S(\text{\AA})$ от центра тяжести белка, где S – функция размера молекулы и гидрофобного ядра. Метод был использован для описания свертывания белковых цепей трипсинового ингибитора (58 остатков) и рубредоксина (54 остатка). При среднем расстоянии остатка от центра тяжести первого белка $10,3 \text{ \AA}$ и второго $9,7 \text{ \AA}$ среднестатистические отклонения опытных и рассчитанных структур составили соответственно $4,7\text{--}6,0$ и $4,0\text{--}6,0 \text{ \AA}$. Авторы отметили, что для белков большей молекулярной массы расчет приводит к менее удовлетворительным результатам.

Во многих исследованиях такого плана к анализу упрощенных моделей привлекаются разные эмпирические соотношения, кристаллографические данные, результаты статистического анализа и гомологии. В первом комплексном подходе к описанию свертывания белка С. Танаки и Г. Шераги [33–36] рассмотрение модели полипептидной цепи сочетается с данными статистического анализа белков известной структуры. Авторы предполагают, что процесс образования конформации проходит через три последовательных этапа. На первом этапе (А) полностью развернутая белковая цепь складывается за счет внутриостаточных и ближних межостаточных взаимодействий в упорядоченные вторичные структуры. Затем (этап В) под влиянием средних взаимодействий между α -спиральными и β -структурными сегментами зарождаются небольшие контактные области. При этом образованные на первом этапе регулярные формы могут претерпевать изменения. На третьем этапе (С) происходит ассоциация контактных областей этапа. В за счет дальних взаимодействий и образование нативной конформации белка.

Начальная форма полипептидной цепи с участками вторичной структуры получена Танакой и Шерагой с помощью эмпирических правил и механико-статистической обработки однострочной модели Изинга. Аминокислотные остатки представлены в виде сфер основной цепи ($-\text{HN}-\text{C}^\alpha\text{H}-\text{CO}-$) и сфер боковых цепей определенных ван-дер-ваальсовых радиусов. Из анализа 25 белков известной структуры найдены частоты контактов между всеми парами остатков (k и l) и для каждого типа пар определены константы равновесия K_{kl} и свободная энергия Гиббса ΔG_{kl} образования контакта между остатками k и l . Процедура поиска конформации белка состоит в следующем. На стадии А цепь представляется порядком символов h , β и c , характеризующих области правой α -спирали, β -структуры и клубка. Остатки, идентифицированные с помощью предсказательного алгоритма, помечаются только одним символом (h или β), а неотнесенные остатки – тремя (h , β , c). Для свертывания цепи используется процедура Монте Карло при последовательном введении средних (этап В) и дальних (этап С) взаимодействий и произвольном варьировании значений углов ϕ , ψ в выбранных областях h и β у отнесенных остатков и символов h , β , c , а при каждом символе – значений углов ϕ , ψ у неотнесенных на этапе А остатков. По ходу счета через определенные промежутки времени отбирались конформации, в которых отсутствует перекрывание жестких сфер

ценивалась энергия всех взаимодействий. Конформация оставалась на следующем счете, если ее энергия оказывалась меньше энергии существующей конформации. Так продолжалось до тех пор, пока энергия данного варианта не понижалась при последующих 10000 итерациях. Метод Танаки и Шераги был использован для предсказания структуры человеческого панкреатического трипсинавого ингибитора. Первоначальная идентификация конформационных состояний всех остатков с помощью символов α , β , γ и, следовательно, определение ограниченной области возможных значений ϕ , ψ выполнены не на основе предсказательных алгоритмов, а рентгеноструктурных данных. Конформации белка на разных стадиях процедуры Монте Карло представлялись в виде контактных треугольников, отражающих по расстояниям между атомами C^α взаимодействия между всеми парами остатков. Сопоставление контактных треугольников (карт Кунтца) опытной структуры и конечной теоретической конформации белка обнаруживает существенные расхождения; отсутствуют контакты, присущие реальной молекуле, и в то же время имеется много лишних контактов. Неудовлетворительное совпадение обнаруживается при грубом, почти качественном способе сравнения, даже когда основная часть информации о структуре небольшого белка, а именно, идентификация конформационных состояний всех остатков, была взята из эксперимента и использована в расчете первого этапа. Помимо расчетной модели, совершенно не отражающей конформационную специфику белковой цепи, метод Танаки и Шераги ограничен также возможностями предсказательных алгоритмов. Особенно настораживает то обстоятельство, что при анализе белка с неизвестной структурой выбранные на этапе А конформационные состояния остатков далее не изменяются. Поэтому допущенные при отнесении с помощью эмпирических корреляций ошибки (они неизбежны и велики) в последующем расчете (этапы В и С) не обнаруживаются.

При использовании процедуры Монте Карло отсутствуют объективные критерии отбора конформаций. Внушительное, на первый взгляд, количество в 10000 структурных вариантов составляет лишь незначительную часть возможного конформационного набора. Наконец, как и в работах Левитта и Уоршела [29–31], Кунтца и соавт. [32], аппроксимация белковой цепи бусиничной моделью, более простой, чем даже полиэтиленовая цепь, продиктована отнюдь не физическими соображениями, а удобствами расчета. Замена боковых цепей сферами лишает их каких-либо конформационных особенностей. В самом деле, трудно представить, как сферы могут передать стереохимию, например, вытянутых лабильных боковых цепей Arg и Lys с их гидрофобными и полярными участками, имеющими четыре степени свободы (χ_1 – χ_4), или плоских боковых цепей Asp, Thr и Phe. Кроме того, неудовлетворителен учет межостаточных взаимодействий, потенциалы которых выбраны на основе незначительного экспериментального материала.

В работе Д. Габела и соавт. [37], близкой только что рассмотренной работе, исходные нулевые приближения взяты уже не из эксперимента, а определены на основе эмпирических корреляций – так называемых тетрагональных пептидных предсказательных алгоритмов, точность которых

незначительна [38, 39]. В данном случае эти алгоритмы, однако, были привлечены не к одной последовательности, а к серии родственных последовательностей – 14 гомологам нейротоксина II, трехмерные структуры которых предполагались идентичными. Из 57 рассмотренных в белке остатков шесть были отнесены к α -спиралям, четыре – к β -структурам и 16 – к β -изгибам. Помимо того, что такое отнесение далеко от реальной структуры, следует отметить еще два существенных, более того, решающих для метода Габела и соавт. обстоятельства, на которых авторы не акцентируют внимание. Во-первых, сделанные предсказания 26 остатков нейротоксина II почти все ошибочны и ни на одном из последующих этапов (всего метод включает десять этапов) не обнаруживаются и, следовательно, входят в конечную структуру. Во-вторых, неоправданным является приписывание основной цепи идентифицированных остатков усредненных значений углов ϕ , ψ , полученных из частот их появлений в низкоэнергетических областях карты Рамачандрана. Углы ϕ , ψ в α -спиральной и особенно β -структурной областях имеют разброс в пределах многих десятков, а часто более сотни градусов. Их конкретные значения определяются не столько природой остатка, сколько уникальной у каждого белка последовательностью аминокислот, т.е. взаимодействиями данного остатка с соседними по цепи и сближенными в глобуле остатками. Приписывание остаткам средних значений двугранных углов в макромолекуле лишено практического смысла, поскольку последующая минимизация энергии не обеспечивает спуск к глобальному минимуму, а лишь приводит к варьированию вблизи локального минимума. Отмеченные два обстоятельства предрешают конечный результат и делают излишним рассмотрение других этапов, на которых также допускается ряд неконтролируемых предположений. Неудивительно поэтому, что ни один из пяти предложенных вариантов конформаций нейротоксина II не отвечает опытным данным даже самого общего характера.

В конце 1970-х и в 1980-е годы исследования подобного плана [40–46] не претерпели существенных изменений и не внесли новых идей в решение проблемы свертывания и структурной организации нативного белка. Для иллюстрации рассмотрим кратко результаты анализа процесса сборки белковой цепи бычьего панкреатического трипсинового ингибитора, полученные С.Миязавой и Р. Джерниганом [46]. Авторы представили белковую последовательность в виде цепочки жестких сфер, совмещенных с атомами C^α и C^β аминокислотных остатков. Конформационными параметрами считались двугранные углы ϕ , ψ , которым разрешалось принимать дискретные значения через каждые 10° . Межостаточные взаимодействия учитывались исключительно между теми парами остатков, которые в кристаллической структуре трипсинового ингибитора образуют близкие контакты. При оценке взаимодействия между двумя остатками энергия принималась равной $-2,2$ ккал/моль, если расстояние между соответствующими атомами C^β в нативной конформации белка находилось в интервале $2,4\text{--}6,5$ Å; когда расстояние было $< 2,4$ Å, энергия считалась бесконечно большой, а $> 6,5$ Å – равной нулю. Следовательно, притяжение друг к другу могли испытывать только те остатки (жесткие сферы) атомы C^β которых сближены в реальной трехмерной структуре. Для

спорядочной генерации различных конформаций, располагающихся между нативным и денатурированным состояниями, была использована процедура Монте Карло. Процесс моделирования цепи оценивался по статистическим величинам, отражающим степень упаковки относительно шкалы конформационной энергии. Всего было получено 30000 промежуточных состояний (из 3^{58} в принципе возможных), не содержащих перекрывания сфер. Авторы [46] проследили путь перехода отдельной цепи от полностью развернутого состояния к состоянию, свернутому подобно нативной структуре белка, и пришли к выводу, что процесс начинается с образования нативно подобных контактов $C^{\beta} \dots C^{\beta}$ в области β -изгиба (остатки 25–28) и α -спирали (48–56). Появление β -изгиба приводит к сближенности атомов C^{β} двух β -тяжей и созданию β -структуры (4–38). Структурирование завершается образованием контактов между N- и C-концевыми атомами C^{β} . Путь свертывания представляет собой непрерывную последовательность конформационных переходов в сторону нативной структуры. Такой результат был ожидаем, более того, он, очевидно, неизбежен, поскольку авторы исключили все неспецифические жестоточные взаимодействия и оставили только те, которые осуществляются в экспериментально наблюдаемой конформации. Используемый Миязавой и Джерниганом подход в принципе не может претендовать на воспроизведение действительного механизма сборки белка, так как заведомо исключена возможность появления промежуточных конформационных состояний с признаками, отсутствующими в нативной структуре.

Заметным образом не изменилась ситуация в рассматриваемой области в 1990-х годах, хотя количество работ, использующих свёрхупрощенные модели белковой цепи, даже возросло. Совсем недавно метод, похожий на метод, впервые предложенный Танакой и Шерагой более 20 лет назад [33–36], был описан Дж. Ганном и соавт. [47] и использован для исследования механизма свертывания миоглобина. Большое сходство с работами конца 1970 – начала 1980-х годов как в познавательном отношении, так и в физическом содержании и точности результатов имеют и другие исследования последних лет [48–56]. В них также используются простейшие модели. Однако недостаток этих работ, как и предшествующих, заключается отнюдь не в самом стремлении упростить решаемую задачу, а в том, что упрощение достигается за счет лишения исследуемого белка всех специфических черт реального объекта. Рассчитываемые модели полипептидов в отношении своей геометрии и силового поля могут быть в равной мере отнесены практически ко всем линейным синтетическим полимерам, причем в данном случае они будут выглядеть более упрощенными.

В рассматриваемых исследованиях по компьютерному воспроизведению свертывания белка используются методы минимизации энергии, которые исключают преодоление потенциальных барьеров, а следовательно, и анализ значительных конформационных изменений или больших энергетических флуктуаций. Это делает конечный результат расчета полностью зависимым от набора исходных структурных вариантов. Их выбор при отсутствии надлежащего критерия неполон и случаен, поскольку даже у свёрхупрощенных моделей количество возможных конформационных

состояний огромно и не поддается расчету. Поэтому гарантированный поиск уникальных межостаточных взаимодействий, формирующих компактную глобулу, невозможен. Обоснованное с физической точки зрения компьютерное воспроизведение процесса самоорганизации трехмерной структуры белка требует не только расчетной модели, учитывающей особенности природной гетерогенной аминокислотной последовательности, но и такого способа оценки энергии невалентных взаимодействий атомов свертывающейся цепи, в котором допускалась бы дифференциация специфических и неспецифических контактов между остатками или, иными словами, разделение необратимых, бифуркационных конформационных флуктуаций и обратимых, равновесных флуктуаций. Предложенные модели и используемые методы минимизации энергии не удовлетворяют обоим требованиям. Поэтому для получения результатов, соответствующих опыту, авторам всех упомянутых выше работ пришлось отказаться от априорности расчета и прибегнуть к искусственному приему – выбору в качестве исходных для минимизации энергии приближений структурных вариантов, включающих важнейшие элементы экспериментально наблюдаемой нативной конформации белка, или использованию эмпирических корреляций. Решение задачи привело к фактическому отказу от независимого описания механизма свертывания белковой цепи и приобрело формальный характер.

Наряду с изучением бусиничных моделей белков, преследовавших воссоздание трехмерной структуры молекулы, почти одновременно возникло еще одно направление теоретических исследований сверхупрощенных моделей, которые не предназначались для предсказания нативной конформации белка. Их цель заключалась в изучении общих закономерностей компактного свертывания белковой цепи в предположении, что явление ренатурации (денатурации) представляет собой двухфазный равновесный процесс. Первая работа нового направления была выполнена в 1978 г. Н. Гё и Г. Такетоми, предложившими так называемую решетчатую модель белка [57–59]. Абстрагирование от геометрии и силового поля реальной аминокислотной последовательности здесь идет еще дальше, чем в бусиничных моделях. Белок представляется в виде плоского, а в более поздних работах – объемного решетчатого полимера, стабилизированного тремя видами взаимодействий. В отношении этих взаимодействий все условно – как качественные, так и количественные характеристики. Неясным остается даже принцип их разделения. Первые два вида можно отнести к внутриостаточным и межостаточным взаимодействиям. Следовательно, критерием разделения в данном случае служит не природа контакта, а место остатков в цепи. Однако такой критерий не отвечает третьему виду взаимодействий – гидрофобному, который определяется сложным комплексом взаимоотношений аминокислотных остатков цепи между собой и водным окружением. Функции, приписываемые гидрофобным взаимодействиям, задаются исходя из нативной конформации белка, которая, тем не менее, остается неизвестной.

В случае плоского варианта задачи предполагалось, что гипотетическая белковая цепь состоит из 49 мономерных единиц и ее "нативная" глобулярная структура свертывается в квадрате 7×7 . Каждая i -я единица

цепи характеризуется связевым углом между векторами, соединяющими три угла решетки ($i-1$ с i ; i с $i+1$), и ближайшим окружением. Связевый угол может принимать значения 0, 90 и -90° . Энергия ближних взаимодействий произвольной конформации решетчатой модели белка выражается суммой энергии связевых углов. У каждого угла энергия отлична от нуля и считается равной $-\epsilon'$ в том случае, если он соответствует связевому углу в решетчатой интерпретации нативной конформации. Таким образом, учитываемые в расчете ближние взаимодействия предпочтительно стабилизируют нативную структуру белка. Дальние взаимодействия делятся на специфические, отвечающие контактам между ближайшими соседями в исходной конформации, и неспецифические. Энергия первых меньше на величину ϵ , одинаковую, как и $-\epsilon'$, во всех случаях, энергии вторых. Следовательно, в отношении дальних взаимодействий нативная структура белка также считается самой предпочтительной. Для учета гидрофобных взаимодействий Гё и Такетоми разделили все узлы решетки на полярные и неполярные и представили белковую глобулу, как состоящую из гидрофобного ядра и гидрофильной оболочки. Полярными остатками считались 24 единицы, находящиеся на "поверхности" квадрата 7×7 "глобулярной нативной" конформации, а неполярными – оставшиеся 25 единиц внутри квадрата. Предполагалось, что конформационная энергия понижается, если ближайшими соседями оказываются неполярные единицы, причем необязательно, чтобы они находились точно в таком же положении, как в "нативной" структуре белка. Поэтому гидрофобные взаимодействия не относятся к специфическим.

Конформационные изменения решетчатой модели производились методом Монте Карло с различными относительными весами дальних и ближних взаимодействий и с вариацией соотношения между их специфическими и неспецифическими составляющими. Полученные результаты позволили авторам сделать следующие выводы феноменологического характера. Во-первых, решетчатая модель описывает равновесный переход свертывания и разворачивания цепи как типичный двухфазный процесс (и, следовательно, полагают авторы, модель отвечает поведению реального белка) только при определенном соотношении между специфическими дальними взаимодействиями и всеми другими взаимодействиями. Во-вторых, скорость процесса свертывания и разворачивания цепи существенно зависит от соотношения специфических и неспецифических взаимодействий. Специфические взаимодействия способствуют образованию у модели локальных нативноподобных структур, объединение которых, в конечном счете, приводит к искомой конформации белковой молекулы. Неспецифические взаимодействия ведут к созданию у модели менее стабильных, флуктуирующих состояний. Решетчатая модель представляет свертывание белковой цепи в нативную конформацию как процесс инициации и постоянного увеличения популяции нативноподобных локальных структур относительно популяции мигрирующих и распадающихся состояний структур развернутой цепи. При увеличении влияния неспецифических взаимодействий модель вырождается в статистический клубок, а при переоценке влияния специфических ближних взаимодействий – в

одномерную структуру. В-третьих, согласованность специфических ближних и дальних взаимодействий увеличивает скорость свертывания полипептидной цепи и делает формирование нативной конформации белка кооперативным процессом.

В последующей работе Н. Гё и Г. Абе [60] детально рассмотрели статистико-механическую модель локальных структур, идея которой уже прослеживалась в изложенных только что исследованиях Н. Гё и Г. Такетоми [57–59]. Под локальной структурой понимается конформация участка полипептидной цепи, которая образуется на определенной стадии процесса свертывания и которая без существенных изменений входит в нативную конформацию белка. В отличие от общепринятого представления о том, что сборка полипептидной цепи начинается с образования вторичных структур, и составляющего основное содержание процесса, а также инициирующего его последующее развитие, Гё и Абе априори не отдают предпочтения ни одной локальной структуре, регулярной или нерегулярной. Наличие α -спиралей, β -складчатых листов, изгибов и прочих образований оценивается их статистическими вкладами и статистико-механическим поведением всей белковой молекулы посредством парциальной функции. В этой функции не учтен вклад стабилизирующих контактов между локальными структурами на отдельных участках цепи. Отсюда и название анализируемого представления о процессе белкового свертывания как модели невзаимодействующих локальных структур. По существу, она аналогична бусиничной модели без подвесок Кунтца и соавт. [32], только в данном случае Гё и Абе представляют белковую цепь не в виде отдельных аминокислотных остатков, аппроксимированных жесткими сферами, а в виде целых конформационно жестких образований, каждое из которых включает непрерывный участок аминокислотной последовательности. Предположение об отсутствии взаимодействий между ними позволяет рассчитать парциальную функцию модели. Но даже в этом случае неперемненными условиями являются знание нативной конформации, которая обязательно должна быть однодоменной, и предположение о равновесности и двухфазности процесса свертывания белковой цепи, т.е. представление его как фазового перехода первого рода. Модель, наверняка, становится несостоятельной, если по ходу сборки образуются локальные структуры, отсутствующие в нативной конформации белка, что, как многократно показано, является экспериментальным фактом.

Одно из наиболее существенных отличий процесса свертывания белковой цепи от перехода спираль–клубок синтетического полимера связано с дальними взаимодействиями, обуславливающими в значительной мере глобулярную форму нативной конформации белков. Свободная энергия глобулы по отношению к энергии полностью развернутого состояния. согласно Гё [61], может быть выражена суммой двух членов, пропорциональных объему и площади поверхности глобулы. При одном и том же объеме энергия системы будет минимальной при реализации пространственного строения белка в форме одной глобулы. Данное соображение послужило основанием для создания Гё однодоменной глобулярной модели свертывания белковой цепи, согласно которой аминокислотная последовательность на любой стадии ее структурирования состоит из двух частей –

глобулы и клубка, а сборка белка заключается в монотонном переходе остатков из одной части, беспорядочно флуктуирующей, в другую — упорядоченную, конформационно жесткую часть. Эта модель Гё, как и все последующие модели с Такетоми [57–59] и Абе [60], находится, таким образом, в полном согласии с термодинамической теорией двух состояний Дж. Брандтса [62–64].

М. Канехиса и Т. Тсонг [65] разработали теорию так называемой кластерной модели равновесного свертывания белковой цепи, которая, в отличие от однодоменной глобулярной модели Гё, допускает существование в рамках двухфазного процесса Брандтса различных путей формирования локальных структур (кластеров). Полипептидную цепь Канехиса и Тсонг рассматривают в виде последовательности чередующихся беспорядочных и упорядоченных областей. К последним отнесены вторичные структуры, повороты цепи и гидрофобные ядра. Предположено, что их образование происходит на ранней стадии структурирования белка и обусловлено главным образом взаимодействием с окружением, которое вызывает, как и поверхностно-активные вещества, уменьшение свободной энергии поверхностного слоя, т.е. ослабление поверхностного натяжения. Статистический вклад беспорядочной области независимо от ее размера полагается равным единице, а вклад упорядоченной области из m остатков определяется произведением $S^m V^n$ (обозначения авторов), где n считается равным $m^{2/3}$. Логарифм первого множителя (S) представляет собой разницу объемной свободной энергии двух состояний ($\Delta\epsilon$), образующуюся в основном за счет вкладов энтальпии невалентных связей в одном из них и конформационной энтропии в другом. Логарифм второго множителя (V) определяет разность поверхностной свободной энергии ($\Delta\sigma$), которая уменьшается при коагуляции упорядоченных областей (т.е. при образовании кластеров) и отделении их от неупорядоченных областей.

В модели Канехиса и Тсонга состояние полипептидной цепи может передаваться набором многих микроскопических конфигураций, отличающихся друг от друга размером кластеров и положением их вдоль цепи. Важнейшими характеристиками состояния являются количества кластеров в последовательности (k) и остатков в кластере (m). Значения k и m ограничены лишь протяженностью цепи. Кластерная модель описывает равновесный двухфазный процесс свертывания, т.е. предполагается существование только двух термодинамических стабильных состояний белковой цепи, отвечающих двум минимумам свободной энергии. Переход между ними сводится к тому, что все микроскопические состояния должны входить в распределение одного оптимального макроскопического состояния или другого. Динамика кластерной модели трактуется как беспорядочный, стохастический процесс, характеризующийся вероятностью переходов промежуточных состояний. Свертывание белка включает стадии зарождения, роста и миграции локальных структур. Случайность процесса означает, что свертывание молекул одного белка при одинаковых исходных состояниях и внешнем окружении может происходить различными путями без соблюдения последовательности соответствующих конкретных событий, но при условии статистической идентичности путем свертывания.

М. Канехиса и Т. Тсонг показали, что динамический процесс свертыва-

ния белка делится на две стадии – медленную и быструю, очередность и продолжительность которых зависят от кооперативности внутримолекулярных взаимодействий макросистемы и от внешних условий. В одних случаях фактором, ограничивающим скорость перехода, является быстрый рост кластера критического размера. Здесь динамика свертывания подобна переходу спираль – клубок гомополипептида. В других случаях скорость процесса определяется более поздней стадией, когда происходит ассоциация образовавшихся ранее мелких кластеров в крупные. Авторы отмечают, что наиболее важная особенность кластерной модели заключается в том, что она демонстрирует возможность сосуществования локальных структур в условиях денатурации в зависимости от свободной энергии поверхностного слоя. Число локальных структур возрастает с ослаблением поверхностного натяжения. Это имеет место в экспериментах с денатурацией белка *in vitro* при высоких концентрациях денатуранта или низких значениях pH. В естественных, физиологических условиях свертывания белковой цепи *in vivo* энергия поверхностного натяжения выше и количество локальных структур меньше.

Н. Гё, рассматривая возможные пути достижения промежуточного, активированного состояния, предполагает, что этой стадии предшествует образование зародышевых, эмбриональных структур [66]. В предложенной им модели, названной эмбрионуклеационной, возникновение эмбрионов происходит за счет ближних взаимодействий, которые могут быть как согласованными, так и не согласованными с дальними взаимодействиями, актуальными для отдельных нуклеаций и белковой глобулы в целом. В первом случае будет иметь место дальнейший рост эмбриона и переход его в стабильную локальную структуру (нуклеацию), а во втором – распад. При согласовании ближних и дальних взаимодействий Гё допускает два механизма свертывания цепи [18]. По одному из них, механизму миграционного развития, эмбрион развивается путем поверхностной сорбции остатков неупорядоченной области и слияния с соседними по цепи эмбрионами. По другому, диффузионно-коллизийному, предложенному М.Карплюсом и Д. Уивером [67], эмбриональный рост происходит в результате столкновения и последующей коагуляции двух (или более) эмбрионов, принадлежащих разным, далеко отстоящим участкам последовательности. Оба механизма не противоречат друг другу и, по-видимому, отражают разные стадии процесса сборки. Первый требует меньшей потери энтропии и поэтому предпочтителен в начальной фазе структурирования. Второй сопряжен со значительным ограничением конформационной свободы и может быть выгоден после создания стабильных эмбрионов, переходящих в нуклеации. Впрочем, П. Ким и Р. Болдвин усматривают в диффузионно-коллизийном механизме еще одну возможность объединения зародышевых форм [68]. Они предполагают, что соударения эмбрионов приводят к конформационным перестройкам, благоприятным для их объединения.

Рассмотренные исследования свёрхупрощенных и плоских решетчатых моделей, а также чисто умозрительные описания процесса сборки белков отражают ситуацию в теоретическом конформационном анализе, сложив-

шуюся к середине 1980-х годов. Общей идейной основой всех высказанных соображений служила теория двухфазного равновесного механизма свертывания белковой цепи, предложенная Брандтсом [62]. Проследим теперь за развитием работ в этой области в последнее десятилетие. Первые теоретические модели сборки белков, по-видимому, из-за их абстрактного характера, вначале не вызвали заметного резонанса. Однако начиная со второй половины 1980-х годов интерес к ним, особенно решетчатым моделям, стал расти. К. Дилл и соавт. [69–78], Дж. Скольник и соавт. [79, 80] увидели в этом подходе новые возможности в изучении общих закономерностей процесса ренатурации. Исследования начались с более детальных разработок плоской решетчатой модели Гё с двумя типами аминокислотных остатков. Простота этой модели позволила Диллу и сотрудникам проанализировать все возможные конформационные состояния белковой цепи и выявить ее типичные реакции на изменение внешних условий. Г. Шерага и соавт. [28] считают, что один из наиболее интересных результатов такого расчета состоит в утверждении, не идущим вразрез с общепринятым мнением, что образование локальных регулярных структур, т.е. α -спиралей и β -складчатых листов, является следствием плотнейшей упаковки и энергетической предпочтительности этих форм. При вариации положений аминокислотных остатков двух типов – полярных и неполярных – была обнаружена избирательность последовательности в отношении образования уникальных конформационных состояний. Показано также, что мутация может быть как нейтральной, так и влияющей на конформацию в зависимости от положения заменяемого остатка в цепи [77, 78]. Расчеты решетчатой модели Дилла связаны с анализом представительного набора всех возможных комбинаций аминокислотных остатков и поэтому могут быть выполнены только для сравнительно коротких цепей (< 30 остатков). Распространение модели на более длинные последовательности сопряжено с отказом от исчерпывающего рассмотрения вариантов и обращением к процедуре Монте Карло [81, 82] и генетическим алгоритмам [83]. Развивая двумерную решетчатую модель, Дилл и соавт. [75, 76] разработали эвристический алгоритм сборки белка, основанный на гипотезе о гидрофобном кооперативном механизме свертывания полипептидной цепи, подобном действию "застежки-молнии" (зиппера). Похожая идея впервые была высказана Р. Мэтесоном и Г. Шерагой, предположившими гидрофобное происхождение нуклеационных ядер [84]. Алгоритм Дилла моделирует односторонний процесс ренатурации и предназначен не для изучения физических аспектов этого явления, а для поиска глобальной конформации в сугубо специфическом ее решетчатом воплощении.

В потоке работ по упрощенному абстрактному моделированию самоорганизации пространственного строения белковых молекул выделяются исследования Е. Шахновича, М. Карплюса и соавт. [85] и П. Леопольда и соавт. [86], расширивших решетчатую модель с плоской до объемной и увеличивших длину рассчитываемой последовательности, оставив неизменным ее предельно простой алфавит из двух букв (типов остатков). Исследовав кинетику процесса свертывания такой цепи в кубическом конформационном пространстве (критерием служило время появления

глобальной конформации при использовании процедуры Монте Карло), авторы работы [85] пришли к выводу о том, что в белковой последовательности помимо геометрии термодинамически самой предпочтительной структуры закодирован и кратчайший путь ее образования. П. Леопольд и Е. Шахнович [87] сформулировали кинетическую гипотезу свертывания белка как альтернативную традиционной термодинамической гипотезе. Против такой точки зрения и, конкретно, против заключения, сделанного в работе [85], выступили Сколник и соавт. [56], посчитав их недостаточно обоснованными. Грубость модели, случайность и неполнота рассчитанных вариантов, а также полученные результаты не позволяют делать обобщенные выводы принципиального порядка. Позднее М. Карплюс и соавт. [88] воспроизвели на кубической решетчатой модели свертывание последовательности из 27 остатков двух типов, рассмотрев полный набор возможных конформационных состояний и идентифицировав в нем состояние, глобальное по энергии. Затем, начиная с флуктуирующего клубка процесс сборки был неоднократно повторен, но при использовании прежней процедуры Монте Карло [85]. Были выяснены частота и скорость появления глобальной ("нативной") конформации при выборочном случайном поиске. Авторы [88] отметили легкость, с которой данная последовательность приходит к этой форме и большой отрыв ее энергии от энергии следующей за ней формы.

Е. Шахнович и А. Гутин предприняли попытку на трехмерной решетке белка из 27 остатков двух типов оценить влияние гетерогенности белковой последовательности на образование уникальной "нативной" конформации [89, 90]. Они также пытались выяснить, варьируя последовательность, условия возникновения компактной глобулярной формы [91, 92]. Авторы отметили определенное сходство модельной системы с реальными белками и сделали вывод, что данная белковая решетка может послужить исходной для последующей детальной разработки. Позже, однако, исследуя свертывание условной цепи из 80 звеньев, Шахнович заключил, что последовательность из 27 звеньев двух типов недостаточно специфична для моделирования реального процесса белкового свертывания в уникальную нативную конформацию [93]. В этой работе автор шел в обратном направлении – от заранее выбранной целевой структуры к конструированию последовательности, следуя ранее развитой процедуре. В конечном счете, он пришел к выводу, что природная белковая цепь оптимальна как в термодинамическом, так и кинетическом отношении.

Дж. Сколник и соавт. [94, 95] создали ряд более сложных трехмерных решетчатых моделей, имеющих по несколько вариантов, различающихся системами координат и количеством взаимодействующих центров, представляющих аминокислотные остатки. Ими описана, например, модель, в которой следующие друг за другом остатки занимают в решетке не ближайшие места, а положения, отвечающие ходу коня в шахматах. Есть модель, в решетке которой предусмотрены дополнительные центры, предназначенные для боковых цепей.

М. Хао и Г. Шерага использовали процедуру Монте Карло для энтропийного отбора проб в исследовании 38-остаточного модельного белка [96]

с помощью пространственной решетки Дж. Сколника и А. Колинского [94] с тремя типами (полярным, неполярным и нейтральным) остатков. Путем селекции последовательностей они показали, что свертывание цепи с оптимизированным порядком представляет собой фазовый переход первого рода, в реализации которого принимают участие кооперативные дальние взаимодействия. Свертывание цепей со случайными порядками происходит только за счет ближних взаимодействий и поэтому не приводит к плотно упакованным структурам. Наивысшим достижением работ Сколника явилось изучение путей свертывания с идентификацией промежуточных стабильных состояний и расчет трехмерных структур белков апопластоцианина и триозефосфатизомеразы со среднестатистическими отклонениями атомов C^α от их действительных положений соответственно 6,0 и 3,0 Å [97]. Однако эти результаты не решили общую проблему свертывания белков, поскольку для их получения были использованы многие детали известных экспериментальных структур. Недавно Сколник и соавт. [55] предложили более общий подход, который свободен от привнесения в расчет опытных данных, касающихся локальных конформационных состояний. Перспективы его еще недостаточно ясны, тем не менее первая попытка независимого определения с его помощью направления закрутки четырех α -спиралей в суперспираль привела к результатам, совпадающим с экспериментом [98].

Новый метод решетчатого моделирования разработали Д. Ковел и Р. Джерниган [99]. В их трехмерной решетке, ограниченной в размерах и форме объемом нативной конформации исследуемого белка, авторы смогли прогенерировать все варианты состояний небольших аминокислотных последовательностей. Используя эмпирические потенциальные функции контактирующих пар остатков, предложенные С. Миязавой и Р. Джерниганом [100], они рассчитали решетчатые конформации пяти низкомолекулярных белков (36–62 остатка). Во всех случаях структура, близкая к нативной, не была самой предпочтительной, но тем не менее находилась в наименьшем по энергии 2%-м наборе конформационных вариантов. Авторы полагают, что метод будет полезен в стартовом определении вероятных путей свертывания аминокислотной последовательности в ограниченном пространстве. Проверка реальных объектов, однако, показала, что метод, как и его более поздняя модификация [101], приводит к заметному расхождению теоретических и опытных конформационных параметров, не меньшему, чем то, которое наблюдалось со сверхупрощенными моделями, предложенными в конце 1970-х годов [29–36]. Тот же качественный уровень имеют последние разработки Д. Хиндса и М. Левитта [102], Ф. Стиллингера, Т. Хид-Гордона и соавт. [103, 104].

Рассмотренные в этом разделе сверхупрощенные представления о белковой цепи и еще более абстрактные плоские и пространственные решетчатые модели сборки белка содержат ряд общих и неизбежных для данного подхода черт принципиального порядка. Аминокислотные остатки белковой цепи во всех моделях представляются в виде жестких сфер или пространственной решетки. Тем самым предполагается возможность решить хотя бы в чисто феноменологическом плане проблему структурной

самоорганизации белка не на атомно-молекулярной основе, а на более грубом уровне. Создатели подобных моделей полагают, что для достижения цели важнее иметь общее представление о конформационном пространстве и размере последовательности, чем знания об атомных деталях. К. Дилл и соавт. [105] вообще отрицают необходимость наличия у свертывающего полимера полипептидной структуры. В своем обзоре, опубликованном в 1995 г., они пишут: "Кодирование уникальной компактной конформации цепи может не требовать аминокислот; оно может требовать только способности синтезировать такие специфические последовательности, в которых, по крайней мере, один тип мономера являлся бы гидрофобным" [С. 561].

Стремление свести рассмотрение конформационных свойств природных аминокислотных последовательностей к анализу решетчатых моделей объясняется не только естественным желанием максимально упростить задачу. Не меньшее значение имело также то обстоятельство, что модели такого вида уже давно использовались в физике полимеров. Впервые и сразу же в квадратном и кубическом вариантах они были предложены в 1947 г. У. Орром [106] при изучении конформационных свойств синтетических гомополимеров и вскоре стали основой дальнейшего развития конфигурационной статистики полимерных цепей. Лишь спустя 30 лет решетчатые модели были опробованы Гё и Такетоми для белков [57]. Моделирование сложного объекта с помощью простых схем может иметь физический смысл и быть оправданным только при одном неперменном условии: исследуемые макроскопические свойства этого объекта, а именно, самопроизвольное свертывание белковой цепи в компактную нативную конформацию, не должны определяться индивидуальными свойствами его микроскопических составляющих, т.е. конкретным химическим строением 20 стандартных аминокислотных остатков.

Условие независимости состояния макросистемы от особенностей ее микросоставляющих соблюдается для синтетических полимеров, в том числе гетерогенных поли- α -аминокислот со случайными порядками, но не соблюдается для природных аминокислотных последовательностей. В доказательном плане и достаточно подробно этот вопрос рассмотрен во введении книги и главе 2. Там показано, что причина исключительной роли белков в процессах жизнедеятельности заключается в особой, присущей только им молекулярной структурной самоорганизации. Среди компонентов биосистем молекулярного уровня и известных искусственных полимеров лишь белковые последовательности способны самопроизвольно свертываться в строго детерминированные трехмерные структуры, геометрия и конформационные возможности которых полностью определяются в физиологических (нативных) условиях составом и порядком аминокислотных остатков в цепи. В настоящее время неизвестен какой-либо другой класс полимерных соединений, наделенных такой же уникальной способностью. Это не значит, что такие полимеры не могут быть созданы в будущем, но у них, как и у белков, должна существовать неразрывная связь между макроскопическим поведением и химическим строением атомных групп мономерных звеньев. Отказ от атомных деталей и реального химического строения белковых молекул делает в прин-

ципе невозможным выявление специфических особенностей механизма свертывания и нативной трехмерной структуры белка.

Пренебрежение конкретной аминокислотной последовательностью и ее конформационной спецификой ведет еще к одному принципиальному ограничению сверхупрощенных моделей. Становится неизбежным предположение о равновесности процесса свертывания белка, что делает возможным его трактовку на основе уже упоминавшейся теории двух состояний Брандтса [62]. Согласно этой теории, сборка белка принимается за фазовый переход первого рода и представляется путем постепенного монотонного увеличения популяции микросостояний нативной конформации при одновременном точно таком же уменьшении популяции микросостояний статистического клубка. В простейшем варианте механизма свертывания белковой цепи профиль популяции (W) выражается зависимостью свободной энергии от степени упорядоченности, имеющей больцмановский вид: $k \cdot \ln W$. В предшествующем томе этого издания [107, гл. 9, 10] и в главах 2, 16 настоящего тома показано, что свертывание белковой цепи не является фазовым переходом, подчиняющимся теории Брандтса и, следовательно, не может быть объектом исследования статистической физики и классической равновесной термодинамики. Самопроизвольный переход аминокислотной последовательности от состояния флуктуирующего клубка к детерминированной трехмерной структуре, т.е. спонтанное возникновение при беспорядочно-поисковом механизме порядка из хаоса, поддается непротиворечивой трактовке и количественному описанию (см. разд. 16.3) только на основе нелинейной неравновесной термодинамики — науки, изучающей статистико-детерминистические явления, суть которых во взаимообусловленности макроскопических и микроскопических свойств большого ансамбля. Появление особых необратимых флуктуаций, возникающих благодаря этой взаимообусловленности, — уникальное свойство белковых молекул, определяемое их химическим строением. Гетерогенность природной аминокислотной последовательности порождает термодинамическую неоднородность флуктуаций, дифференцируя их на обратимые и необратимые. Это ведет к специфической конформационной гетерогенности, а именно, чередованию вдоль цепи конформационно жестких и лабильных участков, которое, в конечном счете, обеспечивает свертывание белковой молекулы и делает этот процесс быстрым и безошибочным [108, 109].

Итак, можно заключить, что, по крайней мере, по двум причинам — неучету конкретной аминокислотной последовательности и представлению свертывания белка равновесным процессом, подход к решению проблемы структурной самоорганизации со сверхупрощенными и решетчатыми моделями белковой цепи бесплоден в принципе, что подтверждается результатами его использования в течение двух десятилетий. Он не содержит независимой системы проверяемых расчетом постулатов или эвристических соображений, не базируется на самостоятельной теории, а получаемые на его основе результаты лишены априорности, т.е. являются прямым следствием исходных представлений авторов об изучаемом явлении.

Моделирование свертывания полипептидной цепи на основе эмпирических корреляций между аминокислотной последовательностью и вторичной структурой – самый распространенный подход к исследованию механизма сборки белка. Впервые он был предложен в начале 1970-х годов Г. Шерагой и соавт. [38, 110, 111] и быстро получил развитие в работах О.Б. Птицына и соавт. [112–120], В.И. Лима и соавт. [121–125] и Р. Сринивасана [126]. В работе Г. Немети и Г. Шераги [12] невалентные взаимодействия, определяющие трехмерную структуру белка, были разделены на внутриостаточные и межостаточные, а последние – на взаимодействия ближнего порядка, к которым отнесены взаимодействия данного остатка (n) с четырьмя предшествующими и четырьмя последующими в цепи остатками ($n \pm 4$), взаимодействия среднего порядка ($n \pm 5-20$) и дальнего порядка ($n \pm n \geq 20$). Для теоретического анализа процесса свертывания белковой цепи и выбора физической модели встал вопрос о функциях отмеченных видов невалентных взаимодействий в структурной самоорганизации белковой молекулы. Вот как их оценивают Немети и Шерага: "Методы, используемые для получения приближенной структуры т.е. такой, которая соответствовала бы минимуму потенциальной энергии нативного глобулярного белка, основываются на положении о том, что конформация остатка в белке определяется главным образом (и не исключительно) внутриостаточными взаимодействиями (Д. Котельчук, Г. Шерага [127, 128]; А.В. Финкельштейн, О.Б. Птицын [129]; Г. Шерага [130]) и принимает свое нативное состояние под влиянием ближних, средних и дальних взаимодействий (Г. Шерага и соавт. [131])". И далее авторы поясняют: "...внутриостаточные взаимодействия играют доминирующую роль в определении конформационных состояний остатков белка. В то же время ближние, средние и дальние взаимодействия определяют действительные значения ϕ и ψ , которые каждый остаток принимает не выходя за пределы своего конформационного состояния, и посредством которых точно описывается окончательная трехмерная структура свернутой полипептидной цепи (А. Бэржес, Г. Шерага [132])" [12, С. 340].

Г. Немети и Г. Шерага считают внутриостаточные взаимодействия ответственными за конформационное состояние остатка, т.е. за выбор низкоэнергетической области потенциальной поверхности ϕ - ψ . При этом они ссылаются на результаты расчета Котельчука и Шераги, ошибочность которых была показана ранее [25, 107]. Таким образом, вопрос о функции взаимодействий между валентно несвязанными атомами боковой и основной цепей в процессе свертывания белка и стабилизации его нативной конформации не был решен.

Роль ближних межостаточных взаимодействий, т.е. взаимодействий центрально остатка в нонапептиде, изучалась Шерагой и соавт. [131] при анализе лизоцима. Аминокислотная последовательность белка была разбита на 4 участка, по девять остатков в каждом. На одном участке при сохранении центрального остатка (n) выделялись три-, пента-, гепта- и нонапептидные фрагменты. Для каждого из них строились конформа-

онные карты Φ_n - Ψ_n , из которых определялись нулевые приближения для последующей минимизации энергии при варьировании только у n -го остатка двугранных углов Φ , Ψ , χ_1 и χ_2 . Геометрические параметры других остатков фрагментов $n \pm 1$, $n \pm 2$, $n \pm 3$ и $n \pm 4$ жестко фиксировались при значениях, найденных в кристаллической структуре лизоцима. В результате были определены оптимальные конформационные состояния центрального остатка и значения энергии отвечающих им пространственных форм три-, пента-, гепта- и нонапептидного фрагментов в каждом из 14 выделенных белковых участков. При сравнении расчетных данных с экспериментальными оказалось, что конформационные состояния всех n -ых остатков в нативной структуре лизоцима соответствуют наиболее предпочтительным по энергии оптимальным формам соответствующих "свободных" олигопептидов. В 11 случаях из рассмотренных 14 наблюдаемые в нативном белке состояния n -ых остатков полностью отвечали их глобальным формам в соответствующих нонапептидах, где они занимали центральное положение. Был сделан вывод, что внутриостаточные взаимодействия определяют возможные для остатка конформационные состояния. Только из этих состояний взаимодействия данного остатка с четырьмя предшествующими и четырьмя последующими остатками (ближние взаимодействия, по классификации Немети и Шераги [12]) выбирают единственную конформацию, которая и реализуется в нативной структуре белка. Средние и дальние взаимодействия, по мнению авторов работы [131], не играют существенной роли. Их функция заключается лишь в дополнительной стабилизации уже детерминированного состояния остатка. Сделанные выводы, однако, нельзя признать корректными, так как фиксация в рассмотренных фрагментах всех остатков за исключением центрального в нативных конформационных состояниях есть хотя и не явный, но тем не менее эффективный учет средних и дальних взаимодействий. Так как в исследовании Шераги и соавт. [131] различные виды невалентных взаимодействий так и остались неразделенными и, по существу, анализировался их интегральный эффект, то эта работа, как и работы [127, 128], также не решила поставленной задачи о функциях внутриостаточных и межостаточных взаимодействий в свертывании белковой цепи.

Рассмотрим теперь работу Бэржеса и Шераги, постановка которой, по-видимому, была обусловлена результатами только что обсужденного исследования, точнее, сделанным в нем заключением о второстепенном значении средних и дальних взаимодействий по сравнению с внутриостаточными и ближними [132]. При традиционном представлении пространственного строения глобулярных белков в виде набора вторичных структур неизбежно стремление упростить анализ межостаточных взаимодействий, или, что еще лучше, избежать его. Такое отношение вызвано принципиальной невозможностью в рамках эмпирического подхода учесть роль этих взаимодействий в свертывании белковой цепи и оценить их вклад в стабилизацию нативной структуры (подробнее см. [25, 107, 108]). В связи с этим выводы работы [131] должны были быть с удовлетворением восприняты всеми исследователями, разрабатывающими предсказательные алгоритмы. Подкрепленное расчетной процедурой утверждение о доминирующем значении внутриостаточных взаимодействий и под-

чиненной роли взаимодействий даже между соседними по цепи остатками казалось весомым и вселяло надежду на возможность обойти проблему множественности минимумов потенциальной поверхности путем использования предсказательных алгоритмов для получения приближенной структуры, минимизация которой приведет к нативной конформации белка. Главная цель следующей работы Бэржеса и Шераги [132] как раз и заключалась в выяснении перспектив эмпирического подхода для предсказания конечной структуры и поиска механизма свертывания белковой цепи. В качестве тест-объекта была выбрана молекула бычьего панкреатического трипсина ингибитора.

Проанализировав существовавшие к тому времени алгоритмы предсказания (Е. Каба и Т. Ву [133–135], Б. Робсона и Р. Пейна [136, 137], П. Чоу и Г. Фасмана [138, 139], Г. Шераги и соавт. [39]), А. Бэржес и Г. Шерага констатировали, что ни один из них не может быть использован для достижения поставленной цели. Затем они переводят свою задачу в гипотетическую область и ведут поиск решения с идеальным алгоритмом предсказания. На основе известной кристаллической структуры БПТИ, а не эмпирических корреляций, авторы относят 58 аминокислотных остатков белка к 5 конформационным состояниям (α_R , α_L , ϵ , ξ_R , ξ_L), отвечающим экспериментальным данным и низкоэнергетическим областям потенциальной поверхности конформационной карты ϕ – ψ . Каждому состоянию они приписывают усредненные по известным кристаллическим структурам восьми белков соответствующие значения углов ϕ , ψ . Двугранные углы боковых цепей (χ) были взяты с округлением до 5° из рентгеноструктурных данных для молекулы БПТИ. Вопреки ожиданиям оказалось, что построенная таким образом трехмерная структура даже отдаленно не напоминает конформацию белка. Ситуация не улучшилась и при минимизации энергии с учетом невалентных взаимодействий. Сравнение контурных карт расстояний между атомами C^α модельной и опытной конформаций показывает, что в собранной с помощью идеального алгоритма экспериментальной геометрии боковых цепей и проминимизированной трехмерной структуре отсутствуют все характерные особенности нативной конформации: удалены друг от друга цистеиновые остатки, образующие между собой дисульфидные связи, практически нет намека на вторичные структуры и не воспроизводится глобулярная форма молекулы трипсина ингибитора. Для исправления положения были введены дополнительные ограничительные условия, облегчающие приближение модельной структуры к нативной конформации. Однако ни учет реализуемой в белке системы дисульфидных связей (5–55, 14–38, 30–51), ни введение сближения соответствующих остатков Cys, ни включение в расчет специальной функции, имитирующей стремление неполярных остатков оказаться внутри глобулы, а полярных выйти наружу, ничто не помогло получить пространственную форму белка, близкую к нативной. Конечно, можно было бы еще более ужесточить условия и добиться совпадения. Но это не имело бы значения, поскольку не повлияло бы на окончательный вывод о невозможности даже в случае 100%-ного правильного предсказания конформационных состояний остатков получить структуру, отдаленно напоминающую реальный белок.

Причину неудавшегося описания структуры Бэржес и Шерага [132] увидели в несовершенстве расчетной процедуры, которая, по их мнению, учитывала только внутриостаточные и ближние межостаточные взаимодействия. Был сделан вывод, что полученные результаты свидетельствуют о необходимости дополнить схему предсказания учетом средних и дальних взаимодействий. Авторы этой работы, как и предыдущей [131], неправы, утверждая, что в расчете игнорировались межостаточные взаимодействия среднего и дальнего порядка. Как уже упоминалось, в действительности они в неявном виде входили в расчетную модель благодаря отнесению геометрии всех аминокислотных остатков полипептидной цепи БПТИ к нативным конформационным состояниям, являющимся конечным результатом воздействия суммарного эффекта всех внутриостаточных и межостаточных контактов. В силу использования процедур, основу которых составила экспериментальная информация о трехмерных структурах белков, результаты исследований [131] и [39] в принципе не могут претендовать на дифференцированное отражение внутримолекулярных невалентных взаимодействий атомов. Таким образом, вопрос о функциональном назначении внутриостаточных и межостаточных контактов в структурной самоорганизации белковой глобулы остался без ответа; по существу, он не рассматривался.

При анализе свертывания белковой цепи на основе концепции регулярных вторичных структур не учитываются экспериментальные данные о реальном механизме сборки белка. Характерной иллюстрацией такого рода моделирования может служить работа О.Б. Птицына и А.А. Рашина [113], посвященная сборке молекулы апомиоглобина. Авторы использовали модель полипептидной цепи, в которой еще до начала манипуляции с ней были заданы в виде цилиндров все α -спирали наблюдаемой нативной конформации белка. Задача, следовательно, свелась к тому, чтобы, зная реальную структуру молекулы, упаковать заданные цилиндры различными способами и оценить энергию их взаимодействий. Расчет велся вручную, поэтому не были учтены все возможные структурные варианты (а их миллионы). Найденное взаимное расположение спиралей, имеющее минимальную энергию, совпало с нативной конформацией апомиоглобина. Однако здесь и речи не может быть о том, что в результате данного исследования стала ясна функция дальних взаимодействий в структурной организации белка, поскольку в состав наперед заданных α -спиралей входит не менее 75% остатков аминокислотной последовательности, а в этом случае была рассмотрена ничтожная часть возможных структурных вариантов.

В качестве примера моделирования свертывания белковой цепи через вторичные структуры остановимся на следующих двух исследованиях О.Б. Птицына [140, 141], типичных по своей постановке, аргументации и некоторым другим качествам для работ этого направления. В одном из них ("Белковое свертывание: общая физическая модель") нативная конформация белковой молекулы представлена как "определенный вид упаковки структурных сегментов (α -спирали и β -структуры)" [140. С. 197]. Главным фактором, стабилизирующим регулярные участки, считаются пептидные водородные связи, не зависящие от природы и порядка

расположения аминокислот в цепи. Контакты между α -спиралями и β -структурами в нативной конформации осуществляются за счет гидрофобных взаимодействий неполярных боковых цепей, скрытых от воды.

Предлагаемая автором модель белкового свертывания не может считаться общей, так как не только не затрагивает фибриллярных белков, но и среди глобулярных имеет отношение только к небольшой группе белков, состоящих преимущественно из α -спиралей и β -структур, образующих супервторичные структуры. Стабилизация последних, как полагает Птицын, не определяется конкретной аминокислотной последовательностью, а представляет собой некий интегрально-статистический эффект, чувствительный лишь к общей контактной гидрофобной поверхности. Оставляя это положение без аргументации, автор формулирует "общую гипотезу направленного механизма белкового свертывания", суть которой заключается в предположении, что "узнавание регулярных сегментов определяется не деталями аминокислотной последовательности, а взаимной локализацией этих сегментов в линейной полипептидной цепи" [140, С. 198]. Постулировав, по существу, независимость супервторичных структур от химического строения белков, Птицын тем самым свел проблеме спонтанной сборки нативных конформаций к выработке геометрических критериев самоорганизации регулярных сегментов. Таким образом, "общая физическая модель" белкового свертывания оказалась не только не общей, но и не физической.

Стадия взаимодействия вторичных структур должна следовать за стадией их образования. Следовательно, до выработки геометрических критериев упаковки вторичных структур в супервторичные необходима идентификация α -спиралей и β -складчатых листов, описание процессов их идентификации, развития и терминации. Задачи, перечисленные в работе [140], предполагаются решенными, что, как известно, не соответствует действительности. Поэтому модель Птицына описывает не весь процесс белкового свертывания, а лишь упаковку вторичных структур, т.е. завершающую стадию, быть может, не отвечающую соответствующей стадии реального механизма самоорганизации. Следует также отметить несовместимость предложенной модели с одним из постулируемых в этой же работе положений. Так, автор, рассматривая вопрос об идентификации α -спиралей и β -структур, исходит из существования корреляций между вторичными структурами и аминокислотной последовательностью, а обуславливая образование из них супервторичных структур, утверждает отсутствие таких корреляций. В основу поиска геометрических критериев упаковки вторичных структур положена простейшая полипептидная цепь – гомополимер из аминокислот с гидрофобными боковыми группами. Предполагается, что такая цепь в водном окружении обладает вторичными структурами, стабилизированными пептидными водородными связями, и супервторичной и третичной структурой, стабилизированной гидрофобными взаимодействиями боковых цепей α -спиралей или β -складчатых листов. Реальное поведение гомополипептидов в растворе не дает, однако, оснований для подобных предположений [25, 142–144]. Молекулы гомополипептидов, как и молекулы других синтетических полимеров, имеют огромное количество близких по энергии непрерывно флуктуирующих в

растворе свернутых форм, среди которых могут быть линейно регулярные. В отличие от белков, здесь не возникает самой проблемы поиска геометрии глобальной структуры; все свойства синтетических, искусственных полипептидов обусловлены их статистической природой и описываются статистической физикой и равновесной термодинамикой. Следовательно, выбор гомополипептида для трактовки строго детерминированного неравновесного процесса свертывания белковой цепи в стабильную трехмерную структуру нельзя признать удачным для подтверждения высказанных положений. Сомнителен также введенный автором принцип "внутренней организации участков аминокислотной последовательности, эквидистантных в отношении середины цепи" [140. С. 200]. Согласно этому "принципу", центр всей последовательности и центры участков при последующем кратном делении наделяются почти мистическими свойствами, не имеющими ничего общего с реальными конформационными свойствами, как синтетических гомополипептидов, так и эволюционно отобранных аминокислотных последовательностей.

В другом исследовании О.Б. Птицын [141] развивает тезис об отсутствии зависимости пространственного строения белковых молекул от их химического строения и тем самым ставит под сомнение эволюционный путь развития белка (и не только его). Так, автор пишет: "Широко распространено убеждение, что уникальная первичная структура данного белка совершенно необходима для сворачивания в определенную пространственную структуру и для его функции и является результатом направленного отбора в ходе биологической революции". В статье представлены аргументы в пользу альтернативной точки зрения, согласно которой типичные пространственные структуры глобулярных белков характерны уже для случайных последовательностей аминокислотных остатков. Поэтому возможно, что первичные структуры белков – в основном просто примеры случайных аминокислотных последовательностей, лишь слегка отредактированных в ходе биологической эволюции для придания им дополнительного функционального смысла [141. С. 574]. Эта мысль развивается О.Б. Птицыным и М.В. Волькенштейном в более поздней совместной работе [145].

Мысль о том, что белки представляют собой случайные аминокислотные последовательности и не требуют естественного отбора, обосновывается утверждением, что усреднение по первичным структурам белков практически не дает статистически достоверных отличий от случайного распределения аминокислотных остатков и их групп вдоль цепи. Это главный и, по существу, единственный аргумент Птицына для отрицания отмеченного выше фундаментального положения молекулярной биологии. Обоснование сделанного автором заключения не корректно, поскольку оно следует из анализа ограниченного экспериментального материала, что не дает права распространять его на все белки. Но и это не главное. Даже если в усредненной первичной структуре распределение действительно не отличается от случайного, то отсюда еще не следует, что случайная последовательность каждого конкретного белка. В понятии "усредненный белок" столько же смысла, сколько, например, в понятии "усредненный мост" или "усредненный автомобиль". Дополнительно сказанное можно

Содержание некоторых аминокислотных остатков в белках (%)

Белок	Lys + Arg	Asp + Glu + Asn + Gln	Cys	Ser + Thr
Пепсин	1,4	2,8	3,5	22,0
Химотрипсिन	8,0	10,0	4,0	21,5
Миоглобин	17,7	24,7	0	8,0
Инсулин	5,5	25,4	11,8	7,3
Гистон	26,4	16,0	0	10,5
БПТИ	17,2	7,0	10,0	7,0
Протеиназный ингибитор Баумена	9,8	16,9	20,0	15,5
Бирка				
β-Липотропин	16,0	15,7	0	9,8
Белки прокариотов	10,7	19,9	1,0	11,9
вирусов	10,5	19,0	2,1	14,9
позвоночных	11,4	20,2	2,5	12,6
человека	10,7	20,3	3,0	13,6

проиллюстрировать данными табл. IV.15, в которой приведено процентное содержание некоторых аминокислотных остатков в ряде белков, сопоставленное с усредненным содержанием тех же остатков в белках прокариотов, вирусов, позвоночных и человека [146]. Из таблицы видно, что даже аминокислотный состав, не говоря уже о порядке расположения остатков и длине цепи, достаточно специфичен для белков. Вывод о случайности химического строения белков не отвечает их действительной структурной организации. Противоречит он также структурно-функциональной и эволюционной организации белковых молекул.

Созданию функциональных белков предшествовало, по мнению О.Б. Птицына [141], появление сложных аминокислотных последовательностей случайного состава и поначалу, т.е. до "редактирования", биологически бесполезных. Белки, как известно, не воспроизводят самих себя. Поэтому для появления "протяженной кооперативной структуры" необходимо предположить существование готового генетического аппарата. Так как он синтезирует случайные и функционально неспецифические аминокислотные последовательности, непонятно, каким образом и почему он возник. Но даже такой, неведомо как и зачем возникший генетический аппарат, имеющий, как и "протяженные кооперативные структуры", случайную последовательность нуклеотидов, не может не только функционировать, но и быть созданным без участия большого числа высокоспецифичных белков. Автор отказывает белкам в эволюции. Очевидно, также следует поступить и по отношению к генетическому аппарату, их производящему. Если следовать такой логике, то это приведет к отрицанию эволюции органического мира вообще, поскольку в основе эволюционного развития любого организма лежит изменение его генов, программ синтезируемых белков.

Большое влияние на специалистов, разрабатывающих алгоритмы предсказаний α-спиралей и β-складчатых листов и на их основе – гипотез

гические схемы укладки белковой цепи в нативные конформации, оказала работа М. Левитта и К. Чотиа по классификации пространственных структур сравнительно небольшой группы белков с преимущественным содержанием вторичных структур на четыре группы (α), (β), ($\alpha + \beta$) и (α/β) [147]. Авторы предложили изучать пространственную организацию этих белков не на уровне конформационных состояний отдельных остатков, а с помощью вторичных структур, беря последние прямо из опыта или оценивая их брутто содержание с помощью статистических методов. При этом неизбежно снижаются требования к ожидаемой информации и появляется возможность решать вопросы о порядке и природе взаимодействий вторичных структур друг с другом, способах укладки α -спиралей относительно β -складчатых листов, предсказательных алгоритмов таксономических групп Левитта и Чотиа и т.д. (подробнее см. [107]). Как прежде из анализа первичных и третичных структур белков выводились зависимости и правила упаковки отдельных аминокислотных остатков во вторичные структуры, так и теперь стали изучать направления свертывания полипептидных цепей в высокомолекулярных белках, анализировать контактные поверхности между сближенными участками α -спиралей и β -структур и выводить правила упаковки отдельных вторичных структур в супервторичные. И если раньше, в 1967 г., Г. Фасман, имея в виду регулярные формы полипептидов, утверждал: "Общепризнано, что лишь несколько конформаций, благодаря своей внутренней термодинамической стабильности, будут встречаться наиболее часто и, по-видимому, именно они составляют общую основу белковой структуры" [148. С. 594], то теперь, по прошествии более двух десятилетий (1989 г.), он, также отражая господствующее мнение, полагает, что "супервторичные структуры являются главными компонентами доменов, которые при взаимодействии образуют трехмерные конформации белков" [149. С. 236].

Заключения Фасмана близки по своей сути и отличаются лишь смещением акцента с вторичных структур на супервторичные и домены как их комбинации. Существенно, однако, то обстоятельство, что изучение более высоких уровней структурной организации белков стало проводиться не после решения задач о формировании регулярных и нерегулярных структурных элементов на локальных участках последовательности, выяснения причин образования α -спиралей и β -структур и выработки надежных правил их идентификации. Эти задачи так и остались нерешенными, как сохранился и чисто эмпирический подход к поиску их решения. В итоге, на мой взгляд, был сделан шаг не вперед, в направлении более глубокого осмысления структурной организации белковых молекул и механизма их сборки, а в сторону от проблемы.

В работах К. Чотиа [150–152], М. Левитта [153–155], Ф. Козна [156–158], К. Козна и Д. Парри [159], Г. Фасмана [160], М. Стернберга и Дж. Торнтон [161–166] и их соавторов, а также других исследователей разрабатываются эмпирические правила упаковки вторичных структур, нахождения областей инициации свертывания, отнесения белков к одной из групп супервторичных структур и т.д. Главным направлением работ 1980-х годов становится сборка преформированных вторичных структур в супервторичные и третичные. Одним из первых исследований такого

плана является работа Р. Ричмонда и Ф. Ричардса [167]. На пути к предсказанию пространственного строения миоглобина авторы рассчитали практически все ($\sim 3 \cdot 10^8$) способы ассоциации шести (из восьми) главных α -спиралей белка, приняв их конформации такими же, какими они были определены рентгеноструктурным анализом. Из рассчитанных комбинаций известных структурных элементов найдено две, удовлетворяющие плотной упаковке, непрерывности цепи и геометрическим условиям встройки гема. Такой же подход и с тем же успехом (среднеквадратичное отклонение атомов $C^\alpha \sim 4.5 \text{ \AA}$) был использован для этого же белка Ф. Коэном и соавт. [168, 169]. Ф. Коэн и соавт. [156–158] развили ступенчатый метод предсказания трехмерной структуры белка по известной аминокислотной последовательности, получивший название комбинированного метода. Он предусматривает проведение трех последовательных стадий: 1) предсказание на основе существующих алгоритмов регулярных вторичных структур; 2) упаковку α -спиралей и β -складчатых листов в конформацию, отражающую характерные особенности нативной структуры; 3) энергетический расчет отобранных конформаций с использованием моделей, подобных сверхупрощенным моделям Левитта и Уоршела [29–31], Кунтца и соавт. [32], Робсона и Осгудорпа [170].

Схема комбинированного метода, на первый взгляд, выглядит достаточно логично. В действительности же она не может быть реализована в отношении всех своих положений, что следовало из уже имевшихся к моменту появления метода экспериментальных данных. Первый пункт схемы невыполним, по крайней мере, по трем причинам. Во-первых, у большей части белков вторичные структуры составляют незначительную долю трехмерной структуры; в среднем, в α -спирали глобулярных белков входит 25–30% остатков, а в β -структуры – 15–20%. Во-вторых, встречающиеся в конформациях белков вторичные структуры, как правило, сильно искажены и лишь условно и при большом желании могут быть отнесены к регулярным. Насколько геометрические параметры реальных конформационных состояний остатков полипептидной цепи могут отличаться от параметров вторичных структур видно из табл. IV.16, в которой приведены значения двугранных углов остатков некоторых сегментов последовательностей α -химотрипсина и лизоцима. Во всех работах, посвященных поиску эмпирических корреляций, эти сегменты отнесены к α -спиральным или β -структурным. И наконец, в-третьих, надежность существующих алгоритмов предсказания, несмотря на оптимистические сообщения (см. ниже), не >50%, что исключает их практическое использование.

Быть может, по этим или иным причинам Коэн, Стернберг и Тейлор [156–158] не стали обращаться к предсказательным алгоритмам, а сразу приступили к реализации второго пункта схемы, выбрав для демонстрации возможностей предлагаемого ими метода белки, изученные рентгеноструктурно, и взяв всю информацию о геометрии вторичных структур непосредственно из эксперимента. Они рассмотрели все способы упаковки β -структурных сандвичей в 11 иммуноглобулиновых доменах, содержащих от 6 до 9 β -складчатых листов. Для каждого домена рассчитано порядка 10^7 – 10^8 различных сочетаний опытных вторичных структур. Количество

**Значения двугранных углов φ , ψ (град) некоторых остатков α -химотрипсина
и лизоцима на участках,
считающихся регулярными вторичными структурами**

Белок	α -Спираль			β -Структура		
	Участок после- довательности	φ	ψ	Участок после- довательности	φ	ψ
α -Химотрипсин	Val ²³¹	-59	-39	Phe ³⁹	-110	131
	Thr ²³²	-49	-42	His ⁴⁰	-62	116
	Ala ²³³	-73	-13	Phe ⁴¹	-121	-17
	Leu ²³⁴	-127	-3	Cys ⁴²	-161	164
	Val ²³⁵	-70	-25	Gly ⁴³	-105	178
	Asn ²³⁶	-62	-45	Gly ⁴⁴	-170	172
	Trp ²³⁷	-63	-39	Ser ⁴⁵	-136	136
	Val ²³⁸	-58	-49	Leu ⁴⁶	-75	133
	Gln ²³⁹	-58	-42	Ile ⁴⁷	-117	-15
	Gln ²⁴⁰	-65	-41	Asn ⁴⁸	-152	164
	Thr ²⁴¹	-61	-43	Glu ⁴⁹	-71	-16
	Leu ²⁴²	-66	-41	Asn ⁵⁰	-112	-9
	Ala ²⁴³	-57	-40	Trp ⁵¹	-136	147
	Ala ²⁴⁴	-85	-11	Val ⁵²	-123	135
	Asn ²⁴⁵	-130	20	Val ⁵³	-108	137
Лизоцим	Val ¹⁰⁹	-57	-44	Asn ³⁹	-100	120
	Ala ¹¹⁰	-62	-36	Thr ⁴⁰	-70	-15
	Trp ¹¹¹	-67	-52	Gln ⁴¹	-97	2
	Arg ¹¹²	-60	-42	Ala ⁴²	-60	136
	Asn ¹¹³	-85	-28	Thr ⁴³	-142	151
	Arg ¹¹⁴	-118	-9	Asn ⁴⁴	-141	125
	Cys ¹¹⁵	-113	-51	Arg ⁴⁵	-83	135
				Asn ⁴⁶	-109	151

вариантов, отобранных для нахождения структур, напоминающих соответствующие кристаллические конформации доменов, составило от нескольких единиц до 4 тыс. комбинаций. Наименьшее среднеквадратичное отклонение атомов C α оказалось равным 5,0 Å. Эта цифра, учитывая небольшие размеры доменов (34–53 остатка) и использование в расчете значительного экспериментального материала, свидетельствует о полной несостоятельности метода.

Аналогичная задача, отвечающая второй стадии комбинированного метода, решалась в работе Бэржеса и Шераги [132], которая уже рассматривалась. В ней также конформационные состояния всех остатков панкреатического трипсинового ингибитора были отнесены не с помощью эмпирических корреляций, а на основе кристаллической структуры молекулы. Оказалось, что рассчитанная с использованием такого идеального алгоритма предсказания, каким является эксперимент, конформация белка даже отдаленно не напоминала его нативную структуру. Следовательно, попытки уложить вторичные структуры в супервторичные и получить

грубое приближение глобальной конформации белка (второй этап комбинированного подхода), полагая успешно пройденным первый этап и считая известными не только α -спирали и β -структуры, но даже конформационные состояния остатков нерегулярных сегментов цепи, сталкиваются с непреодолимыми трудностями. Цель не может быть достигнута и на третьем этапе при использовании найденных ранее структур в качестве нулевых приближений для свёрхупрощенных моделей (разд. 17.1).

Развитый в работах Ф. Коэна, М. Стернберга и соавт. [156–158, 168, 169, 171] подход не опирается на общую физическую теорию и единый метод расчета, устанавливающие логические и количественные связи между аминокислотной последовательностью белка и координатами атомов нативной конформации молекулы. Каждая стадия комбинированного подхода следует своим эмпирическим правилам, корреляционным соотношениям, предсказательным алгоритмам и методологическим приемам. Объединяющим (скорее, отягощающим) все его составные части началом служит традиционное, сложившееся еще в 1950-е годы, представление о пространственной организации белковой глобулы в виде ансамбля регулярных вторичных структур (концепция Полинга и Кори) с внутренним гидрофобным ядром и внешней гидрофильной оболочкой (концепция Козмана). Несмотря на отсутствие заметного прогресса и разочаровывающие результаты предсказаний, стремление решить проблему пространственной организации белков на основе эмпирического подхода не ослабевает ни в 1980-е, ни в 1990-е годы [107. Гл. 6, 7]. Оставаясь на тех же идейных позициях, работы последнего десятилетия приобретают большее разнообразие.

В течение многих лет выделение в кристаллических структурах глобулярных белков α -спиралей и β -складчатых листов делалось в значительной мере произвольно, без использования количественных критериев. Необходимость в них не ощущалась бы, если бы в нативных конформациях белков вторичные структуры были действительно регулярными. Поскольку этого нет, то их идентификация субъективна и существенно отличается у разных авторов. Например, в лизоциме Чоу и Фасман [139] к α -спиралям и β -структурам относят соответственно 54 и 21 остаток. а Бэржес, Поннусвами и Шерага [39] – 46 и 4; в субтилизине BPN' (отнесения работы [39] даны в скобках) – 86 (69) и 27 (44), лапаине – 54 (50) и 30 (21). Подобных примеров можно привести много.

Создание количественных методов компьютерного определения вторичных структур в опытных трехмерных структурах белков необходимо также вследствие усложнения процедуры корреляционного анализа, увеличения количества исследованных рентгеноструктурно белков и по некоторым другим причинам, в частности, из-за неоднозначности результатов предсказания того или иного метода при использовании его разными исследователями. Первые алгоритмы идентификации β -изгибов с помощью ЭВМ по экспериментальным данным были созданы И. Кунтцем [142, 143] и П. Льюисом и соавт. [111]. Позднее они совершенствовались П. Чоу и Г. Фасманом [172], Г. Раузе и Дж. Селтцером [173]. С. Лифсон и К. Сандер [174] разработали компьютерный метод определения β -структуры, а М. Левитт и Дж. Грир [153] создали первый алгоритм установ-

нения протяженности α -спиралей, β -структур и β -изгибов по известным координатам атомов C^α . Еще большей универсальностью обладает алгоритм У. Кэбша и К. Сандера [144], в основу которого положены геометрические особенности вторичных структур и системы их водородных связей. Программа Кэбша и Сандера была использована для идентификации в известных трехмерных структурах 62 белков трех типов конформационных состояний остатков. Согласно полученным данным из 10763 составляющих эти белки аминокислотных остатков 3047 (28%) входят в α -спирали, 2295 (21%) – β -структуры и 5421 (51%) – β -изгибы и другие нерегулярные формы полипептидной цепи. Считая свое отнесение объективным, авторы [144] проверили с его помощью предсказательные возможности трех широко распространенных корреляционных методов, а именно, методов П. Чоу и Г. Фасмана [138, 139, 172], Б. Робсона и соавт. [175] и В.И. Лима [176, 177], предварительно автоматизировав всю процедуру предсказания вторичных структур, сопоставление с экспериментальным отнесением и расчет показателей достоверности. Точность предсказания рассчитывалась как отношение числа остатков, предсказанных правильно, к общему числу остатков, находящихся в данном конформационном состоянии. Оказалось, что показатель качества метода Чоу и Фасмана равен 50%, а методов Робсона и Лима – 56%. Следовательно, около половины остатков, входящих в α -спираль и β -структуру, предсказываются этими методами неверно.

Значения показателей качества, полученные У. Кэбшем и К. Сандером [144], хорошо согласуются с оценками аналогичных методов Б. Бусетты и М. Хоспитала [178] по 38 белкам [47% у метода П. Чоу и Г. Фасмана, 57% – Б. Робсона и 56% – В.И. Лима), а также с оценками Дж. Ленстры [179] по 33 белкам методов К. Нагано [180, 181], В.И. Лима [176, 177], С. Танаки и Г. Шераги [182], П. Аргоса и соавт. [183]. Воспользовавшись для характеристики алгоритмов показателем качества Мэтьюза (Q_7) [184], Дж. Ленстра [179] показала, что достоверность предсказаний перечисленных методов как α -спиралей, так и β -структур и β -изгибов колеблется от 0 до 50%, поднимаясь в редких случаях немного выше, но и опускаясь ниже уровня беспорядочных отнесений.

Обстоятельный анализ предсказательных возможностей корреляционного подхода был проведен К. Нишикавой [185], который также в качестве примеров рассмотрел три уже упоминавшихся алгоритма: Чоу и Фасмана, Робсона и Лима. При идентификации трех состояний (α -спираль, β -структура, клубок) точность определялась по показателю качества Q_3 , дающего наиболее оптимистические оценки (см. ниже), а при идентификации четырех состояний (α -спираль, β -структура, β -изгиб, клубок) использовался показатель Q_4 , занижающий вклад отрицательных предсказаний и более реально отражающий действительные возможности методов [184]. Рассчитанные Нишикавой показатели качества Q_3 попали в интервал 50–53%, а Q_4 – 40–42%.

В результате обращения к количественной оценке эффективности предсказательных алгоритмов стала очевидной их малая достоверность. Примечательно, что при использовании объективных характеристик точности и привлечении большего экспериментального материала, низкий

Содержание аминокислотных остатков в α -спиралях белков

Аминокислотный остаток	Относительное содержание аминокислотных остатков, %			Соотношение количеств аминокислотных остатков	
	в α -спиралях 45 белков (A)	в 45 белках (B)	в белках позвоночных (C)	A/B	A/C
His	2,6	2,1	2,2	1,2	1,2
Trp	1,5	1,3	1,3	1,1	1,1
Tyr	2,9	3,4	3,2	0,8	0,9
Phe	4,0	3,8	4,1	1,0	1,0
Ser	6,3	6,9	7,0	0,9	0,9
Thr	5,2	6,1	5,6	0,8	0,9
Asn	4,7	4,5	4,1	1,0	1,1
Asp	6,5	6,0	5,4	1,1	1,2
Lys	8,2	6,7	6,5	1,2	1,2
Ile	4,7	5,1	5,0	0,9	0,9
Val	6,2	7,1	6,8	0,9	0,9
Leu	7,8	7,7	8,7	1,0	0,9
Gln	4,3	3,6	3,9	1,2	1,1
Glu	6,0	5,6	6,8	1,1	0,9
Cys	1,8	2,4	2,5	0,7	0,7
Gly	7,4	8,7	7,6	0,8	1,0
Ala	10,4	9,0	7,2	1,1	1,4
Arg	3,0	3,8	4,9	0,8	0,6
Met	2,2	1,8	2,3	1,2	1,0
Pro	2,9	4,5	4,9	0,6	0,6

уровень предсказания был обнаружен у всех существующих методов и, следовательно, его нельзя объяснить методологическими особенностями каждого из них. Напрашивается мысль об общей для всех методов причине их низкого качества, имеющей принципиальный характер. Этой причиной является не выдержавшее испытание временем (опытом) представление Полинга и Кори о глобулярных белках как ансамбле вторичных регулярных структур, в стабилизации которых доминирующая роль принадлежит пептидным водородным связям. В табл. IV.17 отражена тенденция аминокислотных остатков встраиваться в α -спираль. В ней приведены результаты статистической обработки Дж. Ричардсоном и Д. Ричардсон [186, 187] 215 α -спиралей в 45 белках с наиболее богатым содержанием вторичной структуры. Во втором столбце таблицы указано процентное содержание аминокислотных остатков в α -спиралях (A), в третьем и четвертом – в последовательностях базовых белков (B) и множества белков позвоночных (C) [146, 188], а в последних двух – отношения A/B и A/C, отражающие склонность остатков встраиваться во вторичную структуру. При отсутствии такой тенденции отношения равны 1. Величины, превышающие 1, свидетельствуют о предпочтитель-

ости соответствующих остатков входить в α -спирали, а величины меньше 1 — избегать их. Учитывая специальный отбор 45 базовых белков, можно было ожидать, что отношение А/В окажется особенно чувствительным к проявлению этих тенденций. Полученные значения А/В и А/С весьма близки и незначительно отличаются от 1. Следовательно, даже в белках с большим содержанием α -спиралей относительное распределение остатков на регулярных и нерегулярных участках последовательностей близко к среднестатистическому, естественному распределению. Индифферентное отношение стандартных аминокислот к α -спиралям указывает на то, что α -спирали образуются в трехмерных структурах белков не благодаря наличию у них индивидуальной склонности к данной вторичной структуре, а за счет кооперативного эффекта природных аминокислотных последовательностей. Решающая роль, таким образом, принадлежит не отдельным остаткам, а их сочетаниям в цепи. Число последних практически бесконечно, и поэтому предсказать их эмпирическим путем не представляется возможным.

Нет сомнения, что вывод о способности всех аминокислот входить в α -спиральные фрагменты белковой цепи справедлив и в отношении β -структуры. На отсутствие у аминокислот избирательности к двум альтернативным вторичным структурам указывают, например, результаты анализа Кэбша и Сандера 62 белков (~10000 остатков) с известными трехмерными структурами [189, 190]. В исследованных белках были, в частности, обнаружены 25 пентапептидных фрагментов, идентичных по последовательности, но существенно отличающихся по пространственной структуре. Те же самые пять аминокислотных остатков у одних белков входят в α -спирали, у других образуют β -складчатые листы, а у третьих составляют различные нерегулярные структуры. Подобные примеры не единичны. Так, гексапептидный фрагмент Val-Glu-Leu-Ile-Arg-Gly в трехмерной структуре нейраминидазы имеет α -спиральную конформацию [191], а в структуре белков вируса табачной мозаики — β -складчатый лист [192]. В различных формах (α -спиральной и β -структурной) реализуется также гексапептидная последовательность Asn-Ala-Ala-Ile-Arg-Ser у фосфофруктокиназы [193] и термолизина [194, 195] (другие примеры см. [196, 197]).

Дж. Лещинский и Г. Раузе проанализировали 67 белков известной структуры, обладающие 270 Ω -петлями, к которым они отнесли полностью нерегулярные участки белковой цепи протяженностью от 6 до 16 остатков с расстояниями между N- и C-концами 3,7–10,0 Å [198]. Структуры, удовлетворяющие таким требованиям, могут принимать от 3⁵ до 3⁹ различных форм основной цепи. Поэтому их предсказание на основе эмпирического подхода исключено. К этой же мысли подводит и более поздняя работа Ф. Коэна и соавт. [199], в которой предпринята попытка, оказавшаяся неудачной, классифицировать встречающиеся в белках Ω -петли.

Результаты анализа Ω -петель у большого количества белков, несмотря на принципиальную недостижимость поставленной Лещинским и Раузе цели, интересны по ряду других причин. Во-первых, показано, что так называемые Ω -петли представляют собой высококомпактные участки белка,

**Коэффициенты встречаемости (f) аминокислотных остатков
в Ω -петлях трехмерных структур белков**

Амино- кислотный остаток	f	Амино- кислотный остаток	f	Амино- кислотный остаток	f	Амино- кислотный остаток	f
Gly	1,3	Ser	1,2	Gln	0,9	Ala	0,8
Pro	1,3	Cys	1,1	Arg	0,9	Leu	0,8
Tyr	1,3	Glu	1,1	Phe	0,9	Ile	0,7
Asp	1,2	Thr	1,1	Trp	0,9	Met	0,7
Asn	1,2	Lys	1,0	His	0,8	Val	0,6

П р и м е ч а н и е. $f = (x_i/x_j)/(n_i/n_j)$, где: x_i – количество аминокислотных остатков типа i в Ω -петлях; x_j – количество остатков типа j в белках; n_i – общее количество остатков в Ω -петлях; n_j – общее количество остатков в белках.

образование которых в процессе свертывания не менее энергетически выгодно, чем образование α -спиралей и β -структур. Следовательно, широко распространенное мнение об исключительной энергетической выгоде регулярных вторичных структур и наибольшей скорости их формирования при свертывании белковой цепи лишено серьезных оснований. Во-вторых, было установлено, что в подавляющем большинстве случаев петли находятся на поверхности глобул и поэтому могут играть определяющую роль в функционировании белков и их конформационной подвижности [200–202]. В-третьих, анализ аминокислотного состава Ω -петель не выявил остатков, наделенных заметной потенцией встраиваться именно в этот вид нерегулярной вторичной структуры. Такое заключение с неизбежностью следует из сопоставления рассчитанных Лещинским и Раузе [198] коэффициентов встречаемости аминокислот в Ω -петлях. Из табл. IV.18 видно, что отклонения этих коэффициентов от 1 как в положительную, так и в отрицательную стороны невелики, что хорошо коррелируется с данными предшествующей таблицы. Если табл. IV.17 демонстрирует индифферентность аминокислот по отношению к регулярной вторичной структуре, то табл. IV.18 – по отношению к нерегулярной. И здесь объективный анализ показывает, что присутствие любого стандартного аминокислотного остатка в α -спирали, β -структуре, β -изгибе или Ω -петле не есть проявление его имманентных свойств.

В течение многих лет, начиная с 1971 г., Робсон занимается разработкой методов предсказания вторичных структур, основанных на теории информации [136, 137, 170, 203–206]. В 1978 г. Робсон и соавт. [207] предложили новый метод, получивший название GORI (аббревиатура первых букв фамилий авторов). Позднее возникли две его модификации, GORI и GORII [208, 209]. Первый вариант [207] построен на предположении о независимости конформационных состояний остатков в трехмерной структуре белка. Во втором [208] – учитываются взаимодействия каждого остатка j с последующим $j + m$ ($m < 8$) с помощью так называемых направляющих информационных параметров, которые рассчитываются по

Достоверность предсказания трех вариантов метода GOR [207–209]

Метод предсказания	Базовые данные		Качество предсказания (q), %	
	Количество белков	Количество остатков	Четыре состояния	Три состояния
GORI	25	~ 4500	49,0	56,0
	51	8898	46,1	54,7
	55	9472	42,6	56,0
GORII	51	8898	46,1	53,8
	55	9472	46,7	57,7
	75	~ 12600	46,5	56,9
GORIII	68	11237	–	63,0
	74	12433	51,9	61,7

Примечание. Качество предсказания $q = F_{S+} / n$, где: F_{S+} – количество правильно предсказанных остатков в состоянии S ; n – общее число остатков в последовательности.

частотам встречаемости пар остатков на участках $j - j + m$ четырех (Н, Е, Т, С) или трех (Н, Е, (Т + С)) типов структур, где Н – α -спираль, Е – β -структура, Т – β -изгиб и С – неупорядоченное конформационное состояние. Наивысшим уровнем информации в принципе располагает вариант GORIII [209], поскольку в нем принимаются во внимание взаимодействия j -того остатка не только с каждым последующим ($j + m$), но и с предшествующим ($j - m$), где $m < 8$. Значения соответствующих коэффициентов, названных парными информационными параметрами, как и в варианте GORII, определялись для четырех и трех состояний эмпирически.

Несмотря на безупречность математической стороны моделей Робсона, они лишены физического смысла, поскольку не отражают реальной структурной организации белковых молекул, где взаимодействия не аддитивны, а кооперативны, и не опираются на необходимый для корректного учета тех же аддитивных парных взаимодействий объем экспериментального материала. Даже при справедливости моделей GORII и GORIII получение достоверных статистических данных о взаимообусловленности конформационных состояний только двух остатков требует набора базовых белков, по крайней мере, на два-три порядка больше использованного. Несовершенство методов GOR наглядно демонстрирует табл. IV.19. Точность предсказательных алгоритмов одинаково низка во всех вариантах и не зависит от количества базовых белков. Во всех случаях качество предсказаний несколько выше, когда выбор делается из трех состояний. Однако при этом возрастает неопределенность самого предсказания. Реальная точность значительно ниже, чем следует из приведенных в таблице средних значений, из-за большого разброса. Так, при средней точности варианта GORII 46,5% (четыре состояния) у ферредоксина правильно предсказаны 22,2% остатков, цитохрома c – 34,0%, цепи А

**Показатели качества методов предсказания (Q_3) вторичной структуры
глобулярных белков по трем конформационным состояниям
аминокислотных остатков**

Авторы метода	Год публикации	Q_3
П. Чоу и Г. Фасман [138, 139]	1974	0,65
Ф. Максфилд, Г. Шерага [210]	1976	0,56
Дж. Гарнье, Д. Осгуторп, Б. Робсон [207]	1978	0,71
О.Б. Птицын, А.В. Финкельштейн [211]	1983	0,64
Дж. Гибрат, Дж. Гарнье, Б. Робсон [212]	1987	0,58
Н. Квиан, Т. Седжновский [213]	1988	0,67
Б. Робсон и соавт. [214]	1988	0,66
Дж. Левин, Дж. Гарнье [215]	1988	0,63
Д. Кнеллер, Ф. Козн, Р. Лангридж [216]	1990	0,79
С. Сольцберг, С. Кост [217]	1992	0,65
Х. Цханг, Дж. Месиров, Д. Вольц [218]	1992	0,67
Р. Маклин, Дж. Шавлик [219]	1993	0,64
Б. Рост, К. Сандер, Р. Шнейдер [220]	1993	0,71

инсулина – 4,8%. В случае GORIII (51,9%; четыре состояния) структура глюкагона правильно идентифицирована на 17,2%, крамбина – на 37,0%, цепи А инсулина – на 9,5% [209].

В последние годы интерес к поиску простых статистических корреляций между аминокислотной последовательностью и вторичными структурами не ослабевает. По-прежнему предпринимаются попытки создать новые методы предсказания, усовершенствовать предложенные ранее, реанимировать забытые. Принципиальных изменений в развитии этого направления, однако, не происходит. На протяжении вот уже трех десятилетий остается неизменной стратегия поиска, покоящаяся на вере в возможность эмпирическим путем и на основе вторичных структур решить одну из фундаментальных проблем молекулярной биологии. Поэтому неудивительно, что практически неизменной осталась и надежность предсказания. В табл. IV.20 представлены показатели качества алгоритмов, разработанных с 1974 г. по 1993 г. и предсказывающих три конформационных состояния аминокислотных остатков (α -спиральное, β -структурное и неупорядоченное). В качестве количественной характеристики использован показатель Q_3 , равный сумме долей положительных и отрицательных правильных предсказаний трех форм остатков ($\omega + \lambda$).

Применение этого показателя не вызывало бы особых возражений, не будь следующих трех обстоятельств. Во-первых, если бы α -спирали, β -структуры и нерегулярные формы входили в белковые третичные структуры приблизительно в равных долях. Известно, что это условие не соблюдается и среднее содержание спиралей не превышает 30%, β -складчатых листов – 20%, а нерегулярных сегментов – 50%. Во-вторых, если бы оценка показателей качества предсказания трех видов структур делалась не последовательно, а одновременно, т.е. независимо. Несоблюдение обоих условий ведет к тому, что при идентификации α -спиралей

вероятность отрицательного правильного предсказания в 2–3 раза выше вероятности положительного правильного предсказания. Еще больший вклад в показатель качества Q_3 вносят отрицательные правильные предсказания β -структуры. Поэтому наиболее распространенный способ оценки качества приводит к завышенным значениям Q_3 и переоценке эффективности корреляционных методов. Насколько может быть далеко от реальности представление о возможностях алгоритмов предсказания, иллюстрируют Г. Шульц и Р. Ширмер [184] следующими типичными примерами идентификации вторичных структур. В первом примере для белка с незначительным α -спиральным содержанием не было сделано ни одного положительного правильного предсказания ($\omega = 0$) при сравнительно большой доле, что почти неизбежно в данном случае, отрицательных правильных предсказаний (например, $x = 0,7$). При таком, казалось бы, плачевном для использованного алгоритма результате (не получено никакой информации о структуре белка) количественная оценка его эффективности по значению Q_3 получается тем не менее удовлетворительной (70% достоверных предсказаний). Если же при этом сделано даже небольшое число положительных правильных предсказаний (например, $\omega = 0,1$), то показатель качества возрастает до 80%, что уже представляется чуть ли не полным соответствием теории и эксперимента.

Более объективен показатель надежности эмпирических корреляций Q_7 , предложенный Б. Мэтьюзом [221]. Он рассчитывается по усредненным значениям ω , x , y , z , т.е. с учетом недопредсказания и сверхпредсказания. В отмеченном выше первом примере его значение составляет $-0,17$, а во втором $+0,38$ при изменении от $-1,0$ (в случае полностью неправильных предсказаний; $\omega = x = 0$) до $+1,0$ ($\omega = x = 1$, $y = z = 0$). Таким образом, в первом примере предсказание хуже, чем среднестатистическое, беспорядочное, $Q = 0$, а во втором – несколько лучше. Значения критерия Мэтьюза для сегментов α -спиралей, β -структур и β -изгибов (неупорядоченное состояние) аденилаткиназы, рассчитанные по лучшим из имеющихся для этого белка предсказаниям, равны соответственно 0,56; 0,58; 0,60, а для лизоцима T_4 – 0,42; 0,28; 0,20 [184].

Наконец, в-третьих, использование показателя качества Q_3 вызывает серьезное возражение, поскольку неупорядоченная форма остатка, в отличие от α -спиральной и β -структурной, не связана с конкретным конформационным состоянием, и поэтому ее идентификация является не предсказанием, а отказом от предсказания. Отмеченные три обстоятельства делают показатель качества Q_3 в значительной мере лишенным физического смысла.

В последние годы начинают проявляться новые элементы в развитии корреляционных методов предсказания вторичных структур и механизма укладки белковой цепи [222]. Правда, они касаются не существа рассматриваемого явления, а скорее чисто формальной стороны эмпирического подхода, отражая вместе с тем определенное разочарование результатами многолетних поисков. Неудовлетворенность чувствуется, например, в обзоре Б. Роста, К. Сандера и Р. Шнейдера, написанном в 1994 г. [223]. В нем авторы, отмечая преодоление предсказательными

алгоритмами уровня 70% по показателю качества Q_3 , приходят к выводу, что конечная цель корреляционных методов – установление трехмерной структуры белка – не может быть достигнута и при значении $Q_3 = 100\%$, т.е. при "правильной" идентификации трех состояний всех остатков. Такое заключение было сделано еще в 1975 г. Бэржесом и Шерагой [132], которые показали, что даже в гипотетическом случае, при наличии совершенного алгоритма, задача получения структуры белка, напоминающего нативную конформацию, остается нерешенной. Примечательно также заключение Максфилда и Шераги, сделанное годом позже при разработке очередного предсказательного алгоритма [210]. Обсуждая надежность результатов статистической обработки белков и понимание на этой основе принципов пространственной организации белковых молекул, авторы приходят к убеждению, что "поскольку любой метод, использующий данные о белках известной структуры будет сталкиваться с теми же статистическими ограничениями, то, по-видимому, невероятно, чтобы изменения в методе, использующем такие данные, привели к значительному увеличению точности, пока количество данных не возрастет", и далее: "...очевидно, имеющиеся предсказательные методы являются бесполезными для понимания структуры белков" [210. С. 5150].

Выводы подобной направленности, предостерегающие от бесплодных поисков простых решений структурной проблемы белка, в литературе почти отсутствуют. Да и процитированное только что высказывание вскоре было дезавуировано одним из авторов в его работе с Немети, где написано о достоверности статистических предсказательных алгоритмов нечто противоположное: "Приложение этих параметров к белкам с известными аминокислотными последовательностями дает вероятные конформационные состояния, которые могут быть использованы в качестве исходных для минимизации энергии. ...Предсказательные схемы являются очень полезными как первый шаг в расчете конформационной энергии" [12. С. 340]. К сожалению, Немети и Шерага не поясняют, каким образом можно получить пригодную для уточнения белковую структуру, если все статистические алгоритмы (и тогда, и спустя двадцать лет) предсказывают неправильно конформационные состояния по крайней мере у половины остатков, причем в случае белка, неисследованного рентгеноструктурно, не известно, какой именно половины.

Б. Рост, К. Сандер и Р. Шнейдер видят выход не в поиске новых, альтернативных путей, а в использовании несколько оригинального для науки способа, заключающегося в снижении предъявляемых к решению проблемы предсказания требований [222, 223]. Они предположили, что трехмерная структура белка может быть предсказана, если в банке данных содержится информация о пространственном строении белков с высокотопологичными последовательностями. К этой достаточно очевидной мысли ранее пришли К. Чотиа и А. Леск [224], У. Тейлор и К. Оренго [225] и авторы других работ [226–231]. Однако, на первый взгляд, такой путь не кажется перспективным, так как более, чем у 80% белков, последовательности которых представлены в банке данных А. Байроха и Б. Бекманна [232], трехмерные структуры неизвестны. "Для этих белков, – пишут авторы обзора [223. С. 13], – предсказание

грехмерной структуры сталкивается с непреодолимыми трудностями. Выход заключается в упрощении проблемы до более простого уровня, поддающегося частичному разрешению".

Б. Рост и К. Сандер решение видят в отказе от предсказания конформационных состояний отдельных остатков последовательности в пользу вторичных структур у целых сегментов, используя данные о гомологичном белке, трехмерная структура которого известна [222]. Сравнение 130 пар структурно гомологичных белков с отличающимися аминокислотными порядками показало, что значительное отклонение в положениях и длинах сегментов вторичных структур во многих случаях может происходить в пределах приблизительно одинаковых пространственных форм свернутых цепей. Иными словами, отличия в двух близких аминокислотных последовательностях в большей мере отражаются на вторичных структурах, чем на третичных. Поэтому, полагают авторы, важна не локализация α -спиралей, β -складчатых листов, β -изгибов и Ω -петель с точностью до одного аминокислотного остатка, а их ориентировочное отнесение, совместимое с нативной конформацией гомологичного белка, установленной экспериментально. Включение информации о белковых семействах ведет к увеличению показателя качества Q_3 до 70,8%, что соответствует точности экспериментального определения вторичных структур с помощью спектров КД. Однако в развитом Ростом и Сандером методе упрощение проблемы предсказания вторичных структур и на их основе третичной столь велико и бесконтрольно, что грани между благими желаниями авторов, субъективным восприятием полученных результатов и декларируемыми количественными показателями точности становятся неразличимы.

В заключение этого раздела можно следующим образом суммировать характерные особенности, присущие всему циклу эмпирических исследований, направленных на поиск зависимостей между аминокислотной последовательностью, трехмерной структурой и механизмом спонтанного свертывания белка (подробнее см. [107. Ч. II]).

1. В основе всех поисков предсказательных алгоритмов лежит конформационная концепция Полинга и Кори, согласно которой трехмерная структура белка представляет собой ансамбль регулярных вторичных структур.

2. Эмпирические корреляции структурной организации белка базируются на гидрофобной концепции Козмана, т.е. на представлении о белковой глобуле, состоящей из гидрофобного ядра и гидрофильной внешней оболочки.

3. Во всех эмпирических исследованиях пространственного строения белковых молекул избегают или упрощают рассмотрение взаимодействий между аминокислотными остатками.

4. В алгоритмах предсказания вторичных структур речь всегда идет лишь о форме основной цепи при полном игнорировании конформационных состояний боковых цепей аминокислотных остатков.

Перечисленные особенности корреляционных методов предсказания неизбежны при эмпирическом подходе. Отказ от одного из них равносителен отказу от решения подобным образом структурной проблемы белка.

Поскольку все особенности противоречат природе рассматриваемого явления и экспериментальным фактам, то такой путь в познавательном отношении следует считать бесперспективным в принципе [25, 26, 233].

17.3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ

Поиски решения проблемы структурной самоорганизации белковых молекул, начатые еще в 1920-х годах К. Мейером и Г. Марком и продолженные У. Астбэри, М. Хаггинсом, Л. Бреггом, Дж. Берналом, Л. Полингом и другими выдающимися исследователями, велись на протяжении почти всего текущего столетия. История этих поисков изложена в предыдущем томе данного издания. Настоящая книга посвящена теоретическим аспектам проблемы и анализу работ последних двух десятилетий. Теоретические разработки последнего периода можно разбить на две большие группы, каждая из которых, в свою очередь, подразделяется на множество вариантов. Во всех случаях главным препятствием на пути к познанию механизма свертывания белковой цепи в нативную конформацию считается проблема идентификации глобального минимума среди практически бесконечного количества локальных минимумов потенциальной поверхности белка.

В работах первой группы, рассмотренных в разделе 17.1, достичь желаемой цели пытаются путем усовершенствования алгоритмических схем, компьютерных программ и процедур минимизации энергии, подхода к проблеме с формальной стороны. В главах 2 и 7 (см. разд. 7.3) была показана не только принципиальная невозможность решить проблему множественности минимумов потенциальной поверхности белков, но и ошибочность самого представления о ее существовании. Поскольку такой проблемы нет, по крайней мере, в том виде и в той формулировке, которые являются общепринятыми [28], то стремление познать процесс самоорганизации белковой цепи только за счет совершенствования методологических приемов (несмотря на очевидное его положительное значение) не может вывести исследования данной направленности из тупикового состояния.

Во второй группе работ, также посвященных изучению структурной организации молекул белка, выход пытаются найти в конструировании моделей, которые могли бы примирить расчетные возможности теоретического подхода с необходимостью получения физически обоснованных результатов или, иными словами, позволили бы количественно описывать глобальную по энергии нативную конформацию и механизм ее сборки, опираясь только на знание аминокислотной последовательности. Обойти проблему множественности минимумов здесь пытаются путем сверхупрощенного моделирования белка, создания плоских и пространственных решетчатых моделей (см. разд. 17.1) и использования эмпирических корреляций (см. разд. 17.2). Помимо иллюзорности самой проблемы, на этом пути допускаются еще две ошибки принципиального порядка. Одна из них вызвана привлечением чрезвычайно простых моделей и состоит в пренебрежении к эволюционно отобранной химической структуре белка

Между тем, белковая цепь среди всех существующих природных и искусственных полимеров уникальна в отношении своей длины, состава и порядка расположения аминокислот, ибо только она склонна к самоорганизации и образованию плотно упакованной стабильной пространственной формы [109]. Вторая принципиальная ошибка заключается в неадекватной оценке проблемной ситуации. Конкретно, это проявляется в использовании при изучении статистико-детерминистического процесса спонтанного свертывания белковой цепи, являющегося естественным объектом нелинейной неравновесной термодинамики, классической равновесной термодинамики, которая в принципе не может описать самопроизвольное возникновение порядка из хаоса как результат случайного стохастического механизма (см. разд. 2.1 и [107, 108]). Отмеченные противоречия отсутствуют в разработанных автором книги бифуркационной теории свертывания природной аминокислотной последовательности (см. разд. 2.1), физической теории структурной организации белка (см. разд. 2.2) и методе конформационного анализа пептидов и белков (см. разд. 7.1 и 7.2). Возможность априорного расчета нативной конформации белка и надежность получаемых результатов продемонстрирована в исследовании пространственного строения сложных олигопептидов (см. гл. 10–13), низкомолекулярных белков нейротоксина II (см. гл. 15) и панкреатического трипсинового ингибитора (см. гл. 16).

В последнее десятилетие сложилась еще одна, достаточно самостоятельная группа расчетных конформационных исследований, отличающихся от работ, рассмотренных в двух предшествующих разделах этой главы, постановкой задачи и методологией. В них не ставится даже в перспективе цель решить теоретическим или эмпирическим путем проблему структурной самоорганизации белка; фактически имеет место отказ от установления логической и количественной зависимости между химическим и пространственным строением белковой цепи. Главной особенностью таких исследований является прямое включение в расчетные схемы экспериментальной информации, прежде всего данных рентгеноструктурного анализа белков и реже ядерного магнитного резонанса. При этом, естественно, снижается научный потенциал и познавательная ценность результатов расчета, однако возрастает их практическая значимость. В работах с использованием сверхупрощенных и решетчатых моделей, а также предсказательных эмпирических корреляций по существу отсутствовало и то, и другое.

В экспериментальной расчетной модели белка, у которого известна только аминокислотная последовательность, начальным структурным вариантом может служить ранее установленная нативная конформация того гомолога. Это основополагающее допущение данного подхода и оно тем более вероятно, особенно в отношении активных центров, чем ближе гомологичных белков субстратные специфичности и биологические свойства. Количественных объективных критериев здесь, однако, нет, и выбор белка известной структуры в качестве геометрического шаблона исследуемого объекта практически всегда произволен. Например, для расчета конформации α -лактальбумина стартовой послужила структура изоцима [234], конформаций трех ингибиторов яда змей – структура

бычьего панкреатического трипсинового ингибитора [235], а ангиогенина – структура рибонуклеазы А [236].

В том случае, когда при совпадении физиологических свойств белков их последовательность отличается небольшим числом аминокислотных остатков, вставок или делеций, гарантия сохранения одинаковых трехмерных структур весьма велика. Выполненный в 1982 г. А.А. Завальным и автором данной монографии априорный расчет конформационных возможностей фрагмента Leu¹–Cys²³ пяти гомологов нейротоксина II, имеющих на этом участке от одной до пяти аминокислотных замен, привел к заключению, что различия в последовательностях практически не сказываются на форме пептидного скелета и геометрии дисульфидного мостика Cys³–Cys²³ [1]. Все остатки гомологов легко встраиваются в рассчитанную для нейротоксина трехмерную структуру, не вызывая ее дестабилизации. Принимаемые иногда новыми остатками иные положения боковых цепей также отвечают низкоэнергетическим областям χ_1 – χ_2 заменяемых остатков белка, которые у гомологов оказываются более предпочтительными. Таким образом, в эволюционно отобранных последовательностях нейротоксинов II одна и та же геометрия пептидного остова предоставляет возможность мутированным аминокислотным остаткам реализовать различные конформационные состояния боковых цепей. У всех гомологов рассчитанные трехмерные структуры фрагмента 1–23 являются глобальными, т.е. при изменении последовательности остаются энергетически самыми выгодными.

Дж. Грир предложил конструировать экспериментальные модели, используя семейство гомологичных белков и выделяя в их последовательностях общие участки, которым приписываются конформационные состояния белка, изученного рентгеноструктурно [237, 238]. Такой способ был опробован им при формировании расчетной модели белка комплемента C5a с привлечением структуры C3a [239] и ренина человека на основе структур нескольких последовательностей аспартатных протеиназ [240]. Аналогичный подход с использованием консервативных участков гомологов для создания у исследуемого белка структурного кора полипептидной цепи был предложен также Т. Бланделлом и соавт. [241–244]. Недавние исследования модельных структур протеиназ, применяемых в медицине, показали, что при использовании информации о семействе белков для выявления активного центра полезными могут оказаться гомологи даже с невысоким содержанием идентичных участков (~ 30%) [245–248].

В настоящее время стал достаточно очевиден порядок проведения структурного моделирования белков на основе экспериментальных данных о конформациях и аминокислотных последовательностях гомологов. Первый шаг, естественно, состоит в поиске одного или более гомологичных белков с известными и близкими друг другу трехмерными структурами. Это самый ответственный и далеко не всегда простой и однозначный этап исследования. Хорошей иллюстрацией может служить пример с установлением структур N-концевых доменов белков CD-антигенов, а именно, белка CD4 [249, 250]. Сравнение последовательностей подсказало, что CD4 может иметь структурное подобие с другими

представителями семейства иммуноглобулинов [251, 252]. Они выбраны в качестве исходных приближений расчетной модели белка CD4, которая затем была проанализирована несколькими группами исследователей [253–256]. Полученная вскоре кристаллическая структура белка подтвердила, что CD4 действительно имеет иммуноглобулиновый тип свертывания полипептидной цепи [249, 250].

После проверки белков на гомологичность в исследовании наступает новый этап – установление у отобранного набора аминокислотных последовательностей переменных и константных участков полипептидных цепей и конструирование модели консервативного кора целевого белка. Опыт, легко объясняющийся бифуркационной теорией свертывания и физической теорией структурной организации белковых молекул (см. гл. 2), показывает, что большая часть изменений в порядках аминокислот у гомологов касается остатков поверхностного слоя белковых глобул, состоящего, как правило, из неупорядоченной полипептидной цепи между фиксированными точками константных областей. В литературе они получили название петельных сегментов. Их конформационные состояния в ряду гомологичных белков более всего несходны, и поэтому предсказываются с помощью соответствующего алгоритма или теоретического анализа с меньшей надежностью. Один из методов определения пространственного строения петель, предложенный Т. Джонсом и С. Тирупом [257] и нашедший широкое применение [241, 244, 258–260], основан на допущении, которое не только нельзя признать очевидным, а напротив, следует считать сомнительным. Авторы метода предполагают, что у всех белков, независимо от их состава и порядка аминокислотной последовательности, внешние петельные сегменты обладают близким пространственным строением, если они состоят из одинакового числа аминокислотных остатков и имеют сопоставимые расстояния между N- и C-концами в трехмерных структурах.

К. Чотиа и А. Леск разработали подобный метод моделирования структуры петель, ориентированный, однако, на специальную группу белковых структур, а именно, содержащих переменные домены иммуноглобулинов [261]. В его основу положена так называемая каноническая гипотеза, согласно которой длина цепи и наличие в ней небольшого числа ключевых аминокислот являются конформационными детерминантами петельного сегмента. Для узкого круга исследованных объектов гипотеза выдержала экспериментальную проверку [262, 263]. Т. Бланделл и соавт. [241, 244, 260] использовали идею ключевых остатков и создали вариант метода Джонса–Тирупа, который можно использовать в отсутствие сравнительных петельных форм в наборе гомологичных структур. М. Левитт и соавт. [264, 265] автоматизировали способ моделирования К. Чотиа и А. Леска, и в таком виде он был использован в конструировании и структурном анализе петель в молекулах антител, синтезированных методами генной инженерии [266–268]. Аналогичный подход реализован также в работах [269–272], подробно рассмотренных в обзорах [273–275]. Г. Шерага и соавт. [276–278] усовершенствовали алгоритм поиска конформационных состояний петельных сегментов, включив в него процедуру локальной минимизации энергии.

Метод исследования геометрии петель, разработанный Дж. Маултоном и М. Джеймсом [279], основан на известных кристаллических структурах белков, которые служат исходными для селекции представительного набора значений двугранных углов ϕ , ψ каждого остатка в низкоэнергетических областях конформационной карты $\phi - \psi$. Из этих наборов генерируются различные структурные варианты петель. Для последующего расчета оставляются те из них, которые удовлетворяют системе эмпирических правил. Отобранные варианты подвергаются минимизации энергии при вариации двугранных углов в потенциальном поле остальной части белка. К. Левинталем и соавт. [280, 281] был предложен метод беспорядочного поиска ("random-tweak") конформации петельного сегмента. От других методов он отличается отсутствием систематического исследования геометрии петли. Ее полипептидная цепь (при игнорировании боковых цепей остатков) составляется путем комбинации случайных пространственных форм фрагментов, приводящих к замыканию петли. В сочетании с процедурой Чотиа и Леска метод Левинтала был недавно использован для создания моделей антител, представляющих терапевтический интерес [282]. Информация об одном из последних методов расчета конформаций петельных сегментов, включающем для замыкания цепи алгоритм регулирования расстояния между концами цепи ("bond-scaling") и процедуру Монте Карло, содержится в работах [283–286]. Несколько новых способов укладки нерегулярных участков белковой цепи на поверхности глобулы с использованием трехмерных структур гомологов, а также приложения их к решению конкретных задач можно найти в работах [227, 287–295].

Задача реконструкции белковой молекулы при отсутствии полной прямой информации о ее трехмерной структуре возникает не только в исследованиях гомологичных белков. Она актуальна при конструировании пространственной модели по известным координатам атомов C^α полипептидной цепи, а также уточнении кристаллической структуры белка низкого разрешения [296, 297]. Решение задачи определения координат всех атомов основной цепи при известных координатах атомов C^α подразделяется обычно на две части. Сначала ведется поиск в имеющемся банке данных ориентировочной геометрии отдельных сегментов [258] с использованием описанных выше методов "запасных частей" ("spare-parts"), подобных методу Джонса–Тирупа [257], а затем привлекаются компьютерные процедуры Монте Карло и минимизации энергии. Наиболее совершенный на сегодняшний день метод реставрации структуры белка, допускающий встраивание боковых цепей (см. ниже), разработан Левиттом [230]. При его апробации на 8 белках, изученных рентгеноструктурно с высоким разрешением, среднестатистическое отклонение атомов C^α в исследованиях Л. Холма и К. Сандера [298], Дж. Уендолоского и Ф. Салемма [259] составило 0,3–0,5 Å.

Компьютерная процедура согласования выбранных значений двугранных углов ϕ , ψ со стандартной валентной геометрией основной цепи впервые была предложена Е. Пурисимой и Г. Шерагой [299] и позднее усовершенствована К. Палмером и Г. Шерагой [277]. Альтернативный способ расчета с введением дополнительных переменных λ_1 и λ_2 , харак-

теризующих взаимную ориентацию смежных пептидных групп и предложенных в свое время К. Нишикавой, Ф. Момани и Г. Шерагой [300], одновременно был разработан Н. Луо и соавт. [301, 302]. Для проверки надежности так называемого λ -алгоритма авторы [302] осуществили реконструкцию трехмерной структуры трипсинного ингибитора при случайных отклонениях атомов C^α от своих экспериментальных положений. Среднестатистическая ошибка составила $\sim 0,4 \text{ \AA}$ при использовании точных координат атомов C^α , $\sim 0,5 \text{ \AA}$ – при произвольном отклонении в $0,2 \text{ \AA}$ и $\sim 0,8 \text{ \AA}$ – при $0,5 \text{ \AA}$.

В методе, предложенном П. Пейном [303], допущено вращение вокруг пептидной связи, которое рассчитывается с помощью потенциала средней силы, определяющего выбор ориентации пептидных групп при данных координатах атомов C^α . А. Рей и Дж. Сколник предложили процедуру реставрации атомов основной цепи, ключевым моментом которой явилась эмпирическая корреляция между ориентацией связи $C^\alpha-C^\beta$ и локальной геометрией виртуальной пептидной цепи из атомов C^α , координаты которых известны [304]. После установления положений атомов C^β знание валентной схемы оказывается достаточным для расчета координат атомов N, C' и O. При проверке метода на шести тестовых белках среднестатистическое отклонение рассчитанных координат атомов основной цепи от экспериментальных составило $\sim 0,7 \text{ \AA}$.

Методы реконструкции трехмерной структуры белка, основанные на молекулярной динамике, описаны П. Корреа [305] и М. Нилгесом и А. Брюнгером [306, 307]. В обоих методах атомы основной и боковых цепей, первоначально находящиеся в беспорядочном или произвольном состоянии, по ходу оптимизации энергии принимали определенные положения в пределах тех ограничений, которые накладываются процедурой молекулярной динамики. Структура α -латикпротеазы была получена с небольшой среднестатистической ошибкой ($0,19 \text{ \AA}$), за что, однако, пришлось заплатить многими часами компьютерного времени [305].

В последние годы все большее внимание начинает уделяться созданию методов расчета конформационных состояний боковых цепей аминокислотных остатков. Пробуждающийся интерес к этой задаче оправдан, поскольку именно боковые цепи, в которые входят две трети атомов белковой молекулы, в значительной мере определяют форму основной цепи и нативную конформацию белка в целом, а следовательно, его биофизические и биохимические свойства. Однако в подавляющем большинстве случаев сейчас, как и ранее, авторы теоретических и эмпирических исследований структурной организации пептидов и белков продолжают исходить из предположения, что конформационное состояние основной цепи определяет ориентации боковых цепей, а не наоборот. Если бы это было действительно так, то структуры всех белков, имеющих одинаковые основные цепи, мало чем отличались бы друг от друга. По аналогичной причине в рассматриваемых ниже работах, которые посвящены полной реконструкции трехмерной структуры белка, задача решается чисто формальным образом, вне связи с физикой реального механизма свертывания белковой цепи в нативную конформацию. Ориентации боковых цепей рассчитываются при фиксированной форме основной цепи, которая

моделируется путем анализа гомологичных белков, берется непосредственно из известной кристаллической структуры исследуемой молекулы или, что совсем ненадежно, предсказывается эмпирическими корреляциями.

Ряд методов строится на идее о том, что конформационные состояния боковых цепей могут быть представлены ограниченным числом канонических комбинаций двугранных углов χ , отвечающих хорошо известным стереохимическим правилам [308–315]. Идея канонических форм боковых цепей сама по себе плодотворна. Однако автономное использование таких форм при заданной структуре основной цепи, а не в качестве составной части метода априорного расчета конформаций белков, базирующегося на физической теории, встречается с большими трудностями [316–318]. При формальном подходе они обусловлены большим количеством структурных вариантов и значительным разбросом значений углов χ в пределах локальных минимумов. Кроме того, анализ конформационных состояний боковых цепей остатков, не зависимый от основной цепи, в теоретическом отношении малоперспективен.

В методе Н. Саммерса и М. Карплюса [319–321], представляющем собой дальнейшее развитие метода Б. Гелина и М. Карплюса [322], задача с ориентациями боковых цепей упрощается посредством представления последних жесткими волчками, т.е. атомными группами, не имеющими, кроме χ_1 , других конформационных переменных. Для застывших боковых цепей были построены так называемые RR-карты ("rigid-rotor-maps"), которые в дальнейшем использованы как их своеобразные энергетические фингерпринты. С помощью этого метода описаны структуры С-концевых доменов аспартатных протеиназ [321]. М. Левитт [230] и независимо Дж. Уендолоцкий и Ф. Салемма [259] разработали уже упоминавшуюся процедуру достройки структуры белка недостающими частями, которая позволяет определять положения боковых цепей и атомов N, C' и O основной цепи по заданным координатам атомов C α и с привлечением банка данных трехмерных структур белков, полученных с высоким разрешением. Метод включает усреднение беспорядочно выбранных конформационных состояний боковых цепей и минимизацию энергии при жестком ограничении положений атомов C α . Среднестатистическая ошибка рассчитанных моделей 8 белков колебалась в пределах 0,91–1,73 Å при учете всех атомов и в пределах 1,40–2,40 Å при учете атомов боковых цепей [230]. Сходная компьютерная программа ранее была использована У. Кэбшем и К. Сандером [190] в рентгеноструктурном анализе комплекса актина с дезазой I.

Литература последних лет содержит еще ряд публикаций, касающихся методологических аспектов полной реставрации белковой структуры по заданной конфигурации основной цепи; имеются также работы с изложением результатов расчета конкретных объектов [323–342]. Однако ни в идейном, ни в практическом отношении они не внесли что-либо принципиально нового и поэтому могут рассматриваться как вариации на тему, подробно изложенную выше. Надежность всех методов конструирования конформационных моделей белков на основе известных трехмерных структур гомологов определяется объемом используемого

расчете экспериментального материала и степенью идентичности аминокислотных последовательностей. В любом случае речь не идет о 100% гарантии. Радикальные изменения в структуру белка могут внести даже единичные замены аминокислот. Классическими примерами здесь являются мутанты гемоглобина. Замещение в нем одного остатка глутаминовой кислоты на остаток валина или лизина приводит к двум различным, но одинаково страшным заболеваниям крови. Свежими иллюстрациями воздействия единичных замен могут служить мутанты λ -репрессора [334].

Г л а в а 18

ГИПОТЕЗА О СТЕРЕОХИМИЧЕСКОМ ГЕНЕТИЧЕСКОМ КОДЕ

В предыдущих главах книги были рассмотрены возможности и перспективы развития двух альтернативных подходов (эмпирического и теоретического) к изучению свертывания белка и принципов его молекулярной структурной организации. В настоящей главе изложен еще один подход, отражающий принципиально иной взгляд на решение тех же проблем. Он исходит из предположения о наличии стереохимического генетического кода, ответственного за сборку белковой цепи в биологически активную трехмерную структуру.

Мысль о существовании второго генетического кода возникла вскоре за установлением Г. Кораной, М. Ниренбергом и Р. Холли в первой половине 60-х годов полного словаря генетического кода, определившего правила трансляции линейных последовательностей информационных РНК в аминокислотные последовательности. Правила оказались простыми, и поэтому показалось естественным предположение о возможности существования подобного кода, теперь уже стереохимического, который, будучи непосредственно связанным с химическим кодом, управляет трансляцией сходящих с полирибосом линейных аминокислотных последовательностей в биологически активные трехмерные структуры белков или их предшественников. Идея о втором генетическом коде родилась в конце 1960-х годов, в завершающий период становления молекулярной биологии, когда в течение предшествующих двух десятилетий открытия величайшей важности следовали одно за другим с редкостной частотой. Вот их далеко не полный перечень: определение аминокислотных последовательностей первых белков, установление структуры и биологических функций ДНК и всех типов РНК, выяснение принципиальной схемы рибосомного синтеза белков, получение ДНК и РНК вне организма, открытие матричного механизма самовоспроизведения, расшифровка трехмерных структур белковых молекул и тРНК, обнаружение структурной самоорганизации молекулярных и надмолекулярных биосистем – конвариантной репликации (ДНК), обратной транскрипции (синтез ДНК на РНК) и

самосборки (белки, рибосомы, тРНК, хромосомы, вирусы). Было показано, что практически беспредельная изменчивость и великое разнообразие внешних форм живого имеют место при постоянстве химического состава и тождественности процессов обмена веществ и энергии, т.е. при общности для всех биологических систем тех первичных и уникальных молекулярных механизмов, которые, в конечном счете, обуславливают остальные атрибуты жизни.

Время 1950–1960-х годов можно смело отнести к одному из самых романтических периодов в истории биологии. Воображение исследователей поражала не только многочисленность фундаментальных достижений, устанавливающих универсальность морфологических, физиологических и эволюционных принципов живой природы, но, быть может еще в большей мере, открывающиеся благодаря этим достижениям удивительная целесообразность и мудрая простота структурной организации элементарных биосистем, как и захватывающая перспектива дальнейших исследований. Действительно, нельзя было не удивляться несложным химическим типам белков, ДНК и РНК. Расшифрованные первыми трехмерные структуры миоглобина и гемоглобина, хотя и имели иррегулярную молекулярную конструкцию, тем не менее, более чем на три четверти состояли из регулярных α -спиралей, ранее обнаруженных у фибриллярных белков и гомополипептидов. Э. Чаргаффом были выведены очень простые соотношения между нуклеотидными остатками ДНК, а Дж. Уотсоном и Ф. Криком сконструирована изящная и чрезвычайно рационально построенная модель двойной спирали ДНК. Для многих исследователей успехи романтического периода послужили не только вдохновляющим примером, но и породили у них поверхностное представление о том, что изучение элементарных биосистем непременно должно приводить к быстрым и простым решениям, что от молекулярной биологии можно ждать любых чудес. Вера в почти неограниченные возможности данной области знаний, причудливым образом переплетаясь с многими другими сферами сознания людей, часто служила причиной появления различных коллизий человеческого ума со свойственными ему фантазиями, ошибками и заблуждениями. Касаясь этой темы, Ф.М. Достоевский писал: "Да, иногда самая дикая мысль, самая с виду невозможная мысль, до того сильно укрепляется в голове, что ее принимаешь, наконец, за что-то осуществимое... Мало того: если идея соединяется с сильным, страстным желанием, то, пожалуй, иной раз примешь ее, наконец, за нечто фатальное, необходимое, предназначенное, за нечто такое, что уже не может не быть и не случиться! Может быть, тут есть еще что-нибудь, какая-нибудь комбинация предчувствий, какое-нибудь необыкновенное усилие воли, самоотравление собственной фантазией..." [343. С. 369].

В бурный период развития науки особенно резко возрастает разрыв между знанием и пониманием. Знание обретается в процессе практических опытных исследований и обнаружения новых фактов и явлений, а понимание, т.е. осмысление этих фактов и явлений, может возникнуть только при наличии достаточно строгих теорий, разработка которых, естественно, отстает от экспериментальных открытий. До появления таких теорий потребность в трактовке опытных данных вынуждена

удовлетворяться разного рода предположениями, гипотетическими представлениями, феноменологическими описаниями и даже спекулятивными соображениями, часто взаимоисключающими друг друга. В 1847 г. Ю. Либих в полемике с Г. Мульдером, автором первой несостоявшейся протеиновой теории белка, высказал мнение, имеющее глубокий смысл и остающееся актуальным для многих современных, в том числе и обсуждаемых в этой главе, теоретических построений: "Теория в естественных науках никогда не бывает абсолютно правильной; она верна только на тот период, в течение которого имеет распространение; теория является самым близким и наиболее точным выражением знаний и наблюдений своего времени. По мере расширения и изменения наших познаний их выражение также расширяется и изменяется, и может случиться так, что оно уже не будет правильным для последующего периода, когда получен ряд новых фактов, в это выражение не укладывающихся. Однако совсем иначе обстоит дело с так называемой протеиновой теорией, которую нельзя рассматривать как одно из подобных теоретических построений. Опирающаяся на наблюдения, сами по себе ошибочные и к тому же неверно истолкованные, она не имела никакого фундамента" (цит. по: [344. С. 45]).

Научные ошибки и заблуждения, если они не тривиальны, входят в качестве важной, более того, совершенно необходимой составной части творческого механизма поиска истины. А. Койре, видный историк науки и философ первой половины XX в., пишет, что история науки не является "хронологией открытий или, наоборот, каталогом заблуждений. , но историей необычайных приключений, историей человеческого духа, упорно преследующего, несмотря на постоянные неудачи, цель, которую невозможно достичь, — цель постижения или, лучше сказать, рационализации реальности. Историей, в которой, в силу самого этого факта заблуждения, неудачи столь же поучительны, столь же интересны и даже столь же достойны уважения, как и удачи" (цит. по: [345. С. 51]). Ф. Бэкон, один из основателей естествознания Нового времени, в начале XVII в. утверждал, что необходимо придавать разуму свинец, который бы сдерживал его полет в область отвлеченных спекуляций. В то же время, развивая свою методологию познания, он отмечал, что извлечению объективных закономерностей из наблюдений над реальной действительностью мешают заблуждения или "призраки", свойственные человеческому разуму. Ф. Бэкон выделил четыре вида "призраков", осаждающих умы людей, из которых я остановлюсь на двух, имеющих, как мне кажется, наибольшее отношение к обсуждаемой теме. Это — "Призраки Рода" и "Призраки Театра".

"Призраки Рода" в той или иной мере свойственны всем людям и коренятся в самой природе человека и его ума. "Человеческий разум, — пишет Бэкон в своей знаменитой книге "Новый Органон", — по своей склонности легко предполагает в вещах больше порядка и единообразия, чем их находит. И в то время, как многое в природе единично и совершенно не имеет себе подобия, он придумывает параллели, соответствия и отношения, которых нет" [346. С. 118]. К этой категории помех относится инерция разума, в силу которой человек с трудом

уступает фактам, противоречащим сложившимся убеждениям. "Разум человека все привлекает для поддержки и согласия с тем, что он однажды принял – потому ли, что это предмет общей веры или потому, что это ему нравится. Какова бы ни была сила и число обстоятельств, свидетельствующих о противном, разум или не замечает их, или отводит и отвергает их посредством различий – с большим и пагубным предубеждением, – чтобы достоверность тех прежних заключений осталась ненарушенной". Далее Бэкон замечает: "Уму человеческому постоянно свойственно то заблуждение, что он более поддается положительным доводам, чем отрицательным" [346. С. 120]. "Призраки Театра" – "не врождены и не проникают в разум тайно, а открыто передаются и воспринимаются из вымышленных теорий и их превратных законов доказательств" [346. С. 125]. Существо этих "призраков" – вера в авторитеты, ослепление ложными теориями, предвзятыми гипотезами и мнениями. Заблуждения такого типа, по мнению Бэкона возникают из-за стремления получить из тривиальных фактов или ограниченного круга опытов далеко идущие выводы только путем одного размышления.

Теперь можно непосредственно перейти к анализу стереохимического генетического кода, который впервые был предложен в 1969 г. Л.Б. Меклером [347] и развивался им все последующие годы [348, 349]. Цель нашего рассмотрения заключается в попытке получить ответы на следующие вопросы.

1. Можно ли сейчас, по прошествии более четверти века со времени первой публикации, считать стереохимический генетический код столь же достоверным опытным фактом, как химический генетический код?

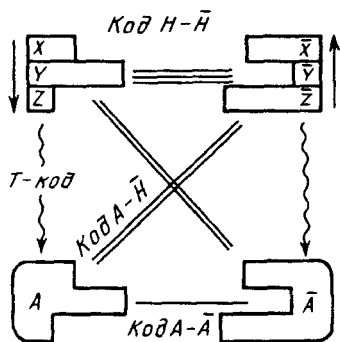
2. Не противоречило ли предположение о стереохимическом генетическом коде имевшимся к моменту его провозглашения экспериментальным данным, т.е. была ли оправдана сама постановка данной проблемы?

3. Не вступило ли предположение о стереохимическом генетическом коде в противоречие с появившимися позднее новыми опытными и теоретическими данными, т.е. является ли эта проблема актуальной в настоящее время?

4. Если стереохимический генетический код не столь же однозначен, как химический генетический код, то можно ли все же его использовать для получения ориентировочных данных с целью последующего уточнения, аналогично тому, как, например, используются рентгеновские дифракционные картины грубого разрешения в кристаллографии белков?

Занимаясь вопросами формирования иммунитета, Меклер пришел к заключению, что генетическая информация, детерминирующая биосинтез ранних белков вируса, записана в нуклеиновой кислоте вириона на плюс-нити, а детерминирующая биосинтез структурных белков вириона – на минус-нити [350]. Из анализа взаимодействий этих белков с соответствующими РНК автор сделал вывод, не отличавшийся достаточной строгостью, что они образуют устойчивые комплексы только с той нуклеиновой кислотой, которая комплементарна нуклеиновой кислоте, осуществляющей трансляцию при биосинтезе данного белка [351]. Если это так, то, полагает Меклер, неизбежно существование перекрестной стерео-

комплементарности и, следовательно, кода, определяющего специфичность взаимодействий аминокислотных остатков полипептидных цепей друг с другом. Об этом же, т.е. о наличии правил, диктующих образование избирательных парных контактов аминокислота–аминокислота и аминокислота–тринуклеотиды, свидетельствует, как безапелляционно утверждается, спонтанность превращения линейных полипептидных цепей в строго детерминированные биологически активные трехмерные структуры белков. "Ибо, что же, как не код, может обеспечить детерминированность, реализующуюся, в конечном счете, на всех уровнях..." [347. С. 583]. Это восклицание, по существу, является главным и чуть ли не единственным заслуживающим внимания аргументом в пользу существования стереохимического генетического кода свертывания белковой цепи. Таковы вкратце предыстория вопроса и обоснование его постановки. Следовательно, можно заключить, что идея Меклера, во всяком случае в момент ее возникновения, не основывалась на сколько-нибудь прочном экспериментальном фундаменте или достаточно веских теоретических соображениях. Причина ее появления – вера автора в существование простых правил самоорганизации белка и белок-нуклеотидных комплексов, которая усиливалась из-за отсутствия собственных альтернативных объяснений и укреплялась незнанием существовавших в то время иных точек зрения. Таким образом, в отличие от химического генетического кода, стереохимический код при его "открытии" нельзя было считать достоверным опытным фактом. Забегая вперед, скажу, что ситуация не изменилась до сегодняшнего дня и таким же, т.е. чисто умозрительным, он и остался. В последующие два с лишним десятилетия Меклер, увлеченный другими идеями глобального характера, порожденными стереохимическим кодом, к получению прямых экспериментальных доказательств его справедливости не обращался. Таков ответ на первый из поставленных выше вопросов. Проявление перекрестной стереоизбирательности, согласно Меклеру, осуществляется посредством двух его кодов (рис. IV.18). Один из них определяет взаимокомплементарные взаимодействия аминокислоты со своими антикодонами ($A-\bar{N}$ -код), а другой – аминокислоту, кодируемую кодоном, с аминокислотой, кодируемой антикодоном ($A-\bar{A}$ -код). Оба кода вместе с кодом, определяющим построение двойной спирали Уотсона–Крика ($N-\bar{N}$ -код), общепринятым генетическим кодом трансляции (Т-кодом) и так называемым П–К-кодом, который обсуждается ниже, образуют общий стереохимический генетический код. Его авторами считают себя Л.Б. Меклер и Р.Г. Идлис, которые утверждают, что общий стереохимический генетический код является "фундаментом всей биологии, ее законом, детерминирующим самоорганизацию, функционирование и эволюцию любых биополимеров..." [352. С. 41]. Мысли авторов, эволюционируя в отрыве от опытных фактов, обретают полностью натурфилософский характер и становятся поистине фантастическими. "Следуя по этому же пути, – пишут Меклер и Идлис в той же работе, – мы, заложив в фундамент всей нашей работы общий стереохимический код, ... увидели простое, естественное и удивительно красивое решение Природой Protein Folding Problem, в свете которого видится логически стройным и целостным все здание биологии, от атомно-молекулярного ее фундамента



Р и с. IV.18. Схема общего стереохимического генетического кода (по Л.Б. Меклеру [347])

XYZ – кодон, $\overline{ZYX}$ – антикодон, А – аминокислота, кодируемая кодоном; $\bar{A}$ – аминокислота, кодируемая антикодоном

до вершины – понимания смысла и цели Жизни. От физики – к химии, от химии – к биологии, от биологии – к социологии, от социологии – к космологии – вот диапазон теории, в рамках которой было получено это общее решение" [352.

С. 40]. На той же основе Меклером и Идлис создается программа "Путь к выживанию и развитию человечества", один из разделов которой озаглавлен: "Человечеству – осознанную единую цель жизни: реализацию антропного принципа соучастия Жизни в эволюции Вселенной".

Сказанное только что родилось из скромного, не имевшего серьезной аргументации предположения Меклера о стереокомплементарности аминокислоты с антиаминокислотой. Затем, отнюдь не в результате прямых экспериментальных и теоретических исследований, а с помощью лишь одной силлогистики, оно последовательно, как бы само собой, стало превращаться в постулат, принцип, открытие, закон, фундамент всей биологии, смысл и цель Жизни и, наконец, в нечто такое, что не имеет еще научного названия. Подобных обобщений не знала не только биология, но и физика и химия на протяжении всей истории естественных наук. Поэтому велико желание убедиться в соответствии декларируемых Меклером и Идлис идей действительному положению дел и справедливости такой высочайшей самооценки авторами их умозаключений. Именно "умозаключений", а не результатов экспериментальных и теоретических разработок механизмов свертывания полипептидных и полинуклеотидных цепей, их взаимодействий, трехмерных структур и конформационных свойств белков. Об этом можно судить по следующей фразе Меклера и Идлис в работе 1993 г.: "Считаем необходимым еще раз подчеркнуть, что общий стереохимический генетический код не придуман ad hoc, не сформулирован "по аналогии", а выведен логически, в результате экстраполяции вниз – до самого низшего уровня организации биологических систем – закономерностей взаимного узнавания и связывания друг с другом элементарных структур иерархии биологических организмов и систем последующих уровней их организации: органов, тканей, клеток, субклеточных структур, биополимеров и, наконец, мономеров, из которых эти биополимеры построены" [352. С. 41]. Открытия кода Н-Н и Т-кода потребовали, как известно, диаметрально противоположного направления поиска.

Анализ обобщенного кода начну с выяснения необходимости и возможности существования компонентов Меклера. В этом отношении общепринятый генетический код никаких сомнений не вызывает. Отмечу лишь две его характерные особенности: во-первых, чрезвычайно тонкую стереокомплементарность потенциальных поверхностей тринуклеотидных пар

у всех взаимодействующих друг с другом кодонов и антикодонов и, во-вторых, энергетическую эффективность кодон-антикодоновых комплексов, которая обеспечивается от 6 до 9 водородными связями и высокой конформационной стабильностью обоих тринуклеотидов. Химический результат кодирования здесь однозначен – это увеличение каждый раз полипептидной цепи, растущей на рибосоме, на определенную аминокислоту L-конфигурации. Генетический код работает со 100%-ной точностью и такой же гарантией. Он имеет четкую и всесторонне доказанную физическую и биохимическую трактовку. В процессе его разработки получены ответы не только на вопросы типа "как?" и "с какой целью?", но и на вопрос "почему?", а следовательно, обретено не только знание, но и понимание механизма кодирования и причины его спонтанного протекания.

Код А-Н, согласно утверждению Меклера, отражает высокую стереокомплементарность каждой аминокислоты своим антикодоном. Однако между ними не только не может быть такой комплементарности, но в данном случае это понятие вообще лишено смысла. Дело в том, что размеры взаимодействующих молекул столь различны, что аминокислота может взаимодействовать разве что только с одним из трех нуклеотидов антикодона, занимая не более половины его ван-дер-ваальсовой поверхности. Такое взаимодействие неспецифично и, следовательно, не в состоянии кодировать образование комплексов аминокислоты со своими антикодонами. Таким образом, кода А-Н в природе не должно существовать. Избирательно могут взаимодействовать не отдельные аминокислоты с кодонами и антикодонами, а полипептидные цепи белков с полинуклеотидами, но формирование подобных комплексов в кодировании не нуждается, да оно и немыслимо.

Код А-А, согласно Меклеру (табл. IV.21,а), играет ключевую роль в механизме самопроизвольного построения физиологически активной конформации белка. Напомню, что он должен определять узнавание и связывание двух аминокислотных остатков полипептидной цепи, один из которых кодируется кодоном, а другой – антикодомом. В работе [352. С. 44] говорится: "Трехмерные молекулы полипептидов и белков строятся согласно коду А-А непосредственно по ходу их синтеза рибосомами в результате последовательного образования – шаг за шагом – соответствующей совокупности А-А-связей формально так же, как строятся трехмерные молекулы полинуклеотидов в результате образования между их нуклеотидами соответствующей совокупности Н-Н-связей". Если это так, то в структурах белков должна наблюдаться избирательная сближенность остатков аминокислот с остатками антиаминокислот и существование кода А-А легко проверяется экспериментально. Такой контроль мог бы быть проведен уже к моменту появления первой публикации, посвященной стереохимическому коду. Кстати, если бы это произошло, то положительный результат проверки оказался бы единственным и весомым опытным фактом в пользу гипотезы о специфической перекрестной стереокомплементарности аминокислот. К 1969 г. были известны трехмерные структуры около десяти белков, так что получить количественное представление о частоте контактов между определенными аминокис-

кислотными остатками не составило бы большого труда. Однако этого не было сделано автором ни тогда, ни в течение последующей четверти века.

В табл. IV.21,б, любезно предоставленной нам С.Г. Галактионовым, приведены частоты остаток-остаточных контактов в трехмерных структурах 44-х негомологичных белков. Под контактом подразумевается сближение атомов C^β боковых цепей аминокислотных остатков на расстояние $\leq 8,0 \text{ \AA}$. Если в белке содержится z_i остатков i -го типа и z_j j -го, то максимально возможное число контактов между ними — $z_i z_j$. Реализованная из этого числа доля контактов с расстояниями $\leq 8,0 \text{ \AA}$ рассчитывалась по формуле $P_{ij} = m_{ij}/z_i z_j$, где m_{ij} — число близких контактов. Приведенные в таблице нормированные значения усреднены по всем 44 белкам с учетом различия в размерах (способ усреднения описан в конце таблицы). Матрица контактов симметрична относительно диагонали, поэтому приведена только одна ее половина.

Во всех 26 меклеровских парах А- $\bar{A}$ частоты встречаемости аминокислотных остатков на близких расстояниях заметно меньше (нередко в два с лишним раза) частот остальных 184 существующих пар. Единственное исключение — пара остатков Ile-Tyr, для которой нормированная частота контактов для Tyr (но не Ile), равная 3,4, немного превышает остальные значения. Таким образом, приведенные в табл. IV.21,б частоты, объективно отражающие реальную ситуацию в кристаллических трехмерных структурах белков, позволяют сделать однозначный вывод о том, что аминокислотные остатки в отношении своих парных взаимодействий не обладают исключительной предпочтительностью к отдельным партнерам. Для сборки белковой цепи в нативную конформацию и ее стабилизации важны не взаимодействия 26 пар аминокислот-антиаминокислот (табл. IV.21,а), а кооперативный эффект одновременного взаимодействия не двух, а целого ряда сближенных друг с другом остатков. Для каждого аминокислотного остатка эффект определяется его координационным числом, т.е. количеством сближенных с ним на ван-дер-ваальсовы расстояния остатков, а также природой их белковой цепи. Это заключение подчеркивает утверждение Меклера о существовании кода А- $\bar{A}$, которое, кстати, противоречило в момент его появления уже существовавшим экспериментальным данным. Следовательно, постановка самой проблемы в конце 1960-х годов не была оправдана. Таков ответ на второй и автоматически на третий поставленные выше вопросы.

Если под кодом понимать ограниченный набор четких правил, выполняемых белковой цепью при структурной самоорганизации с величайшей точностью и высочайшей надежностью, как это имеет место в случае правил, управляющих биосинтезом белка, то можно априори утверждать, что существование кода А- $\bar{A}$ невозможно. Трансляционный генетический код определяет химическое строение полипептидной цепи путем последовательного присоединения аминокислот, каждая из которых (их всего 20) в отношении своей валентной схемы всегда одна и та же. Предполагаемый стереохимический код А- $\bar{A}$ не может в принципе фиксировать для каждого аминокислотного остатка одно и то же конформационное состояние. Это однозначно подтверждается экспериментально,

помимо уже приведенных данных, наличием в трехмерных структурах белков у химически одинаковых остатков большого числа различных пространственных форм. Например, у остатков Lys и Arg их много десятков, а в среднем у одного из 20 стандартных остатков число форм превышает 10. Кроме того, многочисленные результаты конформационного анализа, в том числе представленные в этой книге, свидетельствуют о том, что встречающиеся в белках формы аминокислотных остатков практически изоэнергетичны, т.е. равновероятны, и являются самыми предпочтительными для свободных аминокислот. В том случае, если бы пары остатков A- $\bar{A}$ проявляли при взаимодействии специфичность, это должно было бы выразиться прежде всего в стереокомплементарности их конформационных состояний и, следовательно, привести к унификации для данных остатков A и $\bar{A}$ пространственных форм комплексов A- $\bar{A}$ в структурах всех белков, что не наблюдается.

Как полагают Меклер и Идлис, "обязательный компонент любой A- $\bar{A}$ -связи – водородная связь, образующаяся между полярной группой боковой цепи одного аминокислотного остатка и карбонилем остова полипептидной цепи – компонентом аминокислотного остатка-партнера" [352. С. 43]. Вокруг таких водородных связей имеются гидрофобные рубашки, "защищающие их от атаки молекулами растворителя, в первую очередь, воды. Таким образом Природа обеспечивает образование особых, ранее неизвестных, специфических связей между аминокислотами – A- $\bar{A}$ -связей" [352. С. 44]. Из описанной структурной модели A- $\bar{A}$ -комплекса, однотипной для всех 26 пар аминокислотных остатков, не ясно, почему водородная связь является "обязательным компонентом любой A- $\bar{A}$ -связи". Это исключено по целому ряду причин. Во-первых, стабилизирующая энергия водородной связи, даже если она экранирована от контактов с водой, во много раз уступает суммарной энергии других видов невалентных взаимодействий, прежде всего, дисперсионной энергии. Во-вторых, точечное взаимодействие двух атомов этого "обязательного компонента" не может обеспечить стереокомплементарность остатков A и $\bar{A}$. Напротив, как хорошо известно [353], взаимное расположение групп C=O и H-O (H-N) определяется не столько самой водородной связью, сколько потенциальной энергетической поверхностью окружающих ее атомных групп. Она реализуется только в том случае, если удовлетворяет требованиям других видов невалентных взаимодействий, среди которых наибольшие ограничения накладывают ван-дер-ваальсовы взаимодействия. В-третьих, сближенность акцептора и донора протона требует определенной ориентации друг относительно друга основной цепи одного остатка и боковой цепи другого, что должно лишать конформационной свободы оба аминокислотных остатка и вести к реализации у всех пар A- $\bar{A}$ -связей данного типа одинаковых конформационных состояний. Такая унификация пространственного строения A- $\bar{A}$ -комплексов, как отмечалось, противоречит эксперименту. И наконец, в-четвертых, с предложенной моделью A- $\bar{A}$ -связи не согласуется четко проявляющаяся в трехмерных структурах белков тенденция боковых цепей заряженных остатков (Arg, Lys, Glu, Asp), находящихся на поверхности глобулы, принимать полностью развернутые конформации и ориентироваться в

реду, а не выискивать "свои" антиаминокислоты для образования А- $\bar{A}$ -связей.

Если предположить, что специфические взаимодействия аминокислот с антиаминокислотами все же существуют, несмотря на ошибочность предложенной для А- $\bar{A}$ -связи структурной модели с водородной связью как обязательным компонентом", то естественен в этом случае вопрос, чем же тогда может заключаться исключительность пар А- $\bar{A}$ и какова физическая причина их энергетической предпочтительности по сравнению с другими парными контактами. Меклер и Идлис такой вопрос не только не обсуждают, но даже не ставят. Они просто декларируют, что полярные остатки комплементарны неполярным. В чем же можно усмотреть стереокмплементарную предпочтительность Gly-Ala, Pro-Gly, Lys-Ala, относящихся к А- $\bar{A}$ -парам остатков, перед, например, Trp-Leu, Phe-Tyr, Arg-Glu, не принадлежащих к избранным меклеровским парам А- $\bar{A}$ и, следовательно, не оказывающих определяющего влияния на формирование белковой глобулы [352]? Ввод кода А- $\bar{A}$, согласно которому полярные и заряженные остатки образуют специфические контакты исключительно с неполярными, подрывает физические основы общепринятых трактовок межмолекулярных взаимодействий, в частности, концепций М. Ленгмюра и У. Козмана о взаимодействиях гидрофобных и гидрофильных атомных групп. По-видимому, первые попытки Меклера использовать свой стереохимический код А- $\bar{A}$ для предсказания пространственного строения белковых молекул не привели к желаемым результатам. Только этим, вероятно, можно объяснить также ни на чем не основанное утверждение о существовании двух стабильных структур белков — "жидкой" и "твердой" и введение еще одного специального стереохимического кода — П-К, транслирующего первую структуру во вторую. Свое обозначение он получил в честь Л. Полинга и Р. Кори, хотя они не имеют к нему никакого отношения. "Жидкий" белок является биологически активным и может существовать только в разбавленных растворах; экспериментально его структура не идентифицируется и, следовательно, остается неизвестной. При кристаллизации белка, а также в концентрированных растворах "жидкая" структура переходит в "твердую", которая может наблюдаться с помощью рентгеноструктурного анализа. Причины затвердевания" Меклер и Идлис видят в потере белком конформационной свободы, вызванной ассоциацией молекул и изменением внешних условий.

Опасение, что пространственное строение белков в кристаллической решетке отличается от строения в растворе возникло давно, еще до расшифровки первых рентгенограмм белковых молекул. Ф. Крик, Дж. Кендрью и М. Перутц в начале 1950-х годов обращали внимание на существенные различия в свойствах кристаллов белков и низкомолекулярных соединений. Для первых прежде всего характерна высокая степень гидратации, так что приблизительно треть веса белкового кристалла составляет вода. Поскольку природа среды определяет структуру белка, она не должна изменяться при кристаллизации. Это подтверждается экспериментально. По данным ЯМР в белковых кристаллах вода имеет наряду с гидратной также и "жидкую" фазу. Далее, в кристаллах белков имеется небольшое число контактов между соседними молекулами.

Например, в кристаллах миоглобина и гемоглобина их от 5 до 10, а лизоцима – всего 5. Дж. Рапли, детально изучивший этот вопрос, в своем обзоре пишет: "...кристалл глобулярного белка можно рассматривать как упорядоченный и открытый ансамбль компактных молекул, имеющих почти что минимальный контакт с областью, не занятой твердым веществом. Эта область составляет около половины объема кристалла: она непрерывна, заполнена растворителем, аналогичным основной массе жидкости, и состоит из каналов, способных вместить молекулы соединений с молекулярной массой более 4000" [354. С. 257]. Полностью исключить возможность отклонения структуры белка в кристалле от структуры в растворе тем не менее нельзя. Но несомненно и то, что в большинстве случаев изменения могут коснуться только положений некоторых боковых цепей в областях контактов на периферии глобулы. Вероятность, что конформационные нарушения произойдут, и произойдут именно в активном центре, невелика, конечно, в том случае, когда кристаллизация осуществляется в условиях, близких к тем, при которых фермент или другой белок проявляет активность. При идентичности структур фермента в кристалле и в растворе различия в эффективности катализа могут быть обусловлены лишь разными условиями диффузии субстрата и продуктов реакции и стерическими затруднениями для конформационных перестроек активного центра. Дж. Рапли по этому поводу замечает: "...кристаллический белок обладает ферментативной активностью, и, хотя его свойства несколько отличаются от свойств растворенного белка, сам факт каталитического действия кристаллического фермента служит достаточно убедительным аргументом против предположения о большом изменении конформации в процессе кристаллизации" [354. С. 271]. Таким образом, можно заключить, что рентгеноструктурные данные почти всегда правильно отражают укладку основной цепи белка и, как правило, буквально воспроизводят биологически активную конформацию. Поэтому все, что говорится Меклером и Идлис о "жидком" и "твердом" белке, по моему мнению, представляется глубоко ошибочным и выглядит не более, чем попыткой спасти идею стереохимического кода. Неудачно также отождествление "жидкого" белка с "расплавленной глобулой". Трудно предположить, что короткоживущее промежуточное состояние, которое возникает на последней стадии свертывания полипептидной цепи и о котором пока имеется лишь туманное представление, является активной формой белка, способной функционировать длительное время.

Возражения принципиального порядка вызывает также выбранный Меклером и Идлис способ трансляции гипотетической "жидкой" формы белка в "твердую" трехмерную структуру с помощью кода П–К. Авторы работы [352] утверждают, что согласно коду П–К аминокислотные остатки, принадлежащие к одному из трех компонентов связности графа кода А– $\bar{A}$ [355], узнают друг друга и соединяются посредством так называемых П–К-связей, являющихся пептидными водородными связями NH...OC α -спиралей и β -складчатых листов. Образование совокупности таких связей и вызывает конформационную перестройку всей белковой глобулы и вместе с сохранившимися А– $\bar{A}$ -связями стабилизирует "твердую" трехмерную структуру белка.

При интерпретации кода П–К Меклером и Идлис, на мой взгляд, опущены две принципиальные ошибки, лишаящие код физического смысла. Первая заключается в нереальности исходной посылки о том, что пространственное строение глобулярных белков почти сплошь состоит из регулярных вторичных структур, обладающих бесспорной предпочтительностью по энергии и скорости возникновения перед нерегулярными формами полипептидной цепи. Такое представление сформировалось в начальный период структурных исследований белков (1930–1950 гг.). Впоследствии выяснилось, что оно справедливо лишь по отношению к регулярным компонентам фибриллярных белков и ограниченной группе глобулярных белков. По оценкам различных авторов, среднее содержание α -спиралей и β -структур, причем в большинстве случаев искаженных, не превышает 50% от общего количества аминокислотных остатков белков, регулярные структуры которых известны. Следовательно, большая часть локальных участков белковых молекул иррегулярна. Это обстоятельство делает несостоятельным традиционное представление о структурной организации белка и ненужным введение кода П–К. Вторая принципиальная ошибка, сделанная авторами при расширении стереохимического кода, состояла в переоценке роли водородной связи $\text{NH}\dots\text{OC}$ в формировании вторичных структур. Об этом уже говорилось выше при рассмотрении кода А– $\bar{\text{A}}$. Добавлю лишь ряд конкретных замечаний, касающихся α -спирали и β -складчатого листа. Представленные в этой книге результаты расчетов конформационных состояний пептидов и белков показали, что вторичные структуры являются оптимальными в отношении дисперсионных, электростатических и торсионных взаимодействий, а также водородных связей. Только благодаря гармонии всех видов взаимодействий валентно-несвязанных атомов Полингу и Кори удалось правильно предсказать их геометрию, сделав в принципе ошибочное предположение об исключительной роли в стабилизации вторичных структур пептидных водородных связей. Последние были лишь ценным геометрическим критерием идентификации α -спирали и β -складчатого листа.

Возможности общего стереохимического генетического кода Меклер и Идлис иллюстрируют построением, исходя из аминокислотной последовательности, пространственной структуры молекулы тахиплезина – гептадекапептида, содержащего четыре остатка Cys, образующих в нативной конформации два дисульфидных мостика $\text{Cys}^3\text{--Cys}^{16}$ и $\text{Cys}^7\text{--Cys}^{12}$:

$\text{Arg}^1\text{--Trp}^2\text{--Cys}^3\text{--Phe}^4\text{--Arg}^5\text{--Val}^6\text{--Cys}^7\text{--Tyr}^8\text{--Arg}^9\text{--Gly}^{10}\text{--Ile}^{11}\text{--Cys}^{12}\text{--Tyr}^{13}\text{--Arg}^{14}\text{--Lys}^{15}\text{--Cys}^{16}\text{--Arg}^{17}$.

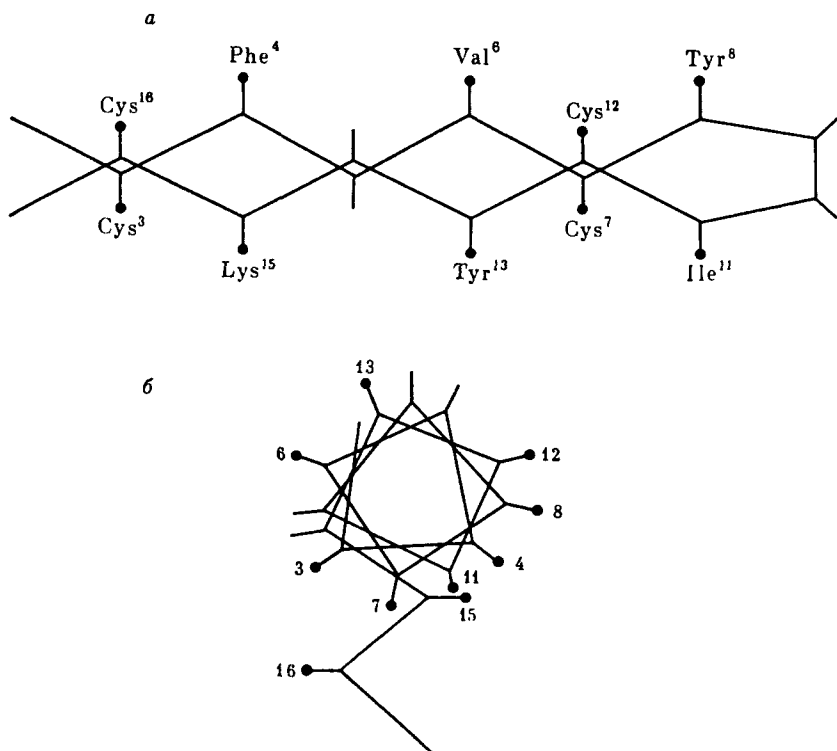
На этом примере, пишут авторы, "мы продемонстрируем, как, исходя из разработанной нами теории, можно за считанные минуты проявить смысл генетического текста, кодирующего и строение, и программу работы этой маленькой биологической микромашины, т.е. вручную, без всякого компьютера, построить и А– $\bar{\text{A}}$ -модель, и П–К-модель этой трехмерной молекулы" [352. С. 47]. По поводу постановки задачи замечу, что быстрота построения модели, работа вручную и игнорирование компьютера не являются самыми большими достоинствами научного исследования.

Проследим теперь за всеми этапами сборки структуры тахиплезина.

Она строится из ленты, разграфленной на квадраты, которые отвечают аминокислотным остаткам. Лента, согласно стереохимическому коду, причудливым образом сворачивается и в определенных местах скрепляется английскими булавками. В собранной конструкции неизвестными остаются координаты атомов и конформационные состояния остатков, а их боковые цепи вообще отсутствуют. По своему информационному содержанию построенная конструкция аналогична рентгеноструктурной модели белка, полученной при грубом разрешении в 6–8 Å. Стремясь как можно документальнее передать авторскую логику построения модели, я при последующем изложении буду часто обращаться к оригинальному тексту.

Перед демонстрацией исключительных возможностей собственного подхода Меклер и Идлис "констатируют", что "сегодня молекулярная биология, исходя из аминокислотной последовательности даже такого маленького полипептида, ничего не может сказать ни о его трехмерной структуре вообще, ни о положении его S–S-связей в частности. Ибо огромное число степеней свободы этой полипептидной цепи исключает возможность рассчитать ее конформацию согласно законам физики и химии, например, исходя из величин энергий взаимодействий ее атомов. Согласно теории, которую мы разработали, трехмерная структура любого полипептида определяется биологически – совокупностью A–A-связей, образующихся между его аминокислотными остатками" [352, С. 47]. Эта цитата примечательна двумя высказанными в ней положениями. Первое свидетельствует о незнании авторами литературы, посвященной теоретическому конформационному анализу пептидов и белков, становление которого произошло в 1963 г. с появлением основополагающей работы Г. Рамачандрана и соавт. [356]. Прямым опровержением такого заявления Меклера и Идлис о неспособности физики и химии рассматривать подобные проблемы служат, во-первых, результаты расшифровки генетического кода трансляции, которые были получены как раз с помощью физики и химии, и, во-вторых, материал этой книги и ее библиография, насчитывающая многие сотни ссылок на теоретические конформационные исследования пептидов и белков. Второе положение касается не чисто научных, а в большей мере мировоззренческих вопросов. Оно возвращает читателя к казалось бы давно ушедшим временам, когда в материалистической философии серьезно обсуждалось существование механической, физической, химической и биологической особых форм движения материи, находящихся в субординационных отношениях.

По стереохимическому коду A– $\bar{A}$ в молекуле тахиплезина могут взаимодействовать между собой и образовывать A– $\bar{A}$ -связи Phe⁴–Lys¹⁵, Val⁶–Tyr⁸ и Tyr⁸–Ile¹¹. В отношении взаимодействий остатков Ile¹¹ с Tyr¹³ и Tyr⁸ с Val⁶, также удовлетворяющих этому коду, сказано, что они "не могут реализоваться, ибо A– $\bar{A}$ -связи между аминокислотными остатками, порядковые номера которых отличаются друг от друга на 1 или 2, стерически невозможны" [352, С. 47]. Это следует считать недоразумением, поскольку такие взаимодействия реальны и осуществляются в α -спиралях, β -структурах и других пространственных формах. Последуем, однако, за авторами, которые полагают, что "реализация... трех A– $\bar{A}$ -связей... стерически возможна и приводит к тому, что полипептидная цепь



Р и с. IV.19. Схемы β -структурной (*a*) и α -спиральной (*b*) моделей молекулы тахиплезина (по Л.Б. Меклеру [352])

тахиплезина складывается пополам. В результате Cys¹² оказывается напротив, т.е. в суперпозиции к Cys⁷, а Cys¹⁶ – напротив, т.е. в суперпозиции к Cys³ [352. С. 48]. По трем остаток-остаточным контактам и местам локализации двух S-S-мостиков идентифицируется β -структурная конформация гептадекапептида (рис. IV.19,*a*). Далее, по бумажной ленточной модели вручную подгоняется атомная модель "жидкой" молекулы. И использованные для ее построения данные о взаимодействиях пяти пар остатков, утверждают авторы, оказались необходимыми и достаточными, чтобы считать результат описанной процедуры бесспорным. Если перевести эти слова на язык математики, то Меклеру и Идлис удалось совершить невозможное – прийти к однозначному ответу при решении системы уравнений, содержащих более 40 неизвестных конформационных параметров основной цепи (двугранные углы ϕ , ψ , ω) и приблизительно столько же неизвестных боковых цепей (углы χ_1 , χ_2 , ...), располагая всего лишь пятью известными параметрами. Таким условиям, несомненно, может удовлетворять большое число структур тахиплезина, состоящих только из низкоэнергетических состояний всех аминокислотных остатков. Действительно, мне удалась первая же попытка найти еще одну из них.

Ею оказалась α -спиральная конформация гептадекапептида, в которой сближенными оказываются те же меклеровские остатки А и $\bar{A}$, что и в β -структуре, а Cys³ и Cys⁷ могут образовывать дисульфидные связи соответственно с Cys¹⁶ и Cys¹² (рис. IV.19,б).

В одном из интервью Меклер следующим образом описывает свой творческий процесс создания трехмерных структур пептидов и белков: "Когда я строю молекулу из ленты, я руками и всем вижу, что происходит" (цит. по: [357. С. 75]). А на вопрос о том, почему при столь многолетней работе со стереохимическим кодом не удалось формализовать задачу в виде машинного алгоритма, он ответил: "Я вовсе не уверен, что ее легко формализовать... Когда я это делаю, я вижу, я чувствую молекулу, как она строится и как потом будет работать" (цит. по: [357 С. 75]). Весьма красноречивое авторское признание субъективности созданного им подхода. Одну из последних своих статей Меклер и Идлис назвали: "Общий стереохимический генетический код – путь молекулярной биологии в XXI в." [352]. Убежден, что в этом предложении можно смело поставить отрицание "не" перед словом "путь".

Обсуждаемый достаточно широко в литературе вопрос о взаимодействии пептидов и сегментов белков, закодированных комплементарными цепями ДНК (так называемые sense and antisense peptides), рассматривается в следующем томе настоящего издания.

Глава 19

ОБРАТНАЯ СТРУКТУРНАЯ ЗАДАЧА ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ

Проблема структурной организации пептидов и белков включает в себя две противоположные по постановке задачи. Первая из них (назову ее прямой структурной задачей) связана с установлением пространственного строения и конформационных, динамических свойств природных олиго- и полипептидов по известной аминокислотной последовательности. Анализу различных аспектов и оценке перспектив развития существующих подходов к решению этой задачи посвящены все предшествующие главы книги. Цель обсуждаемой в заключительной главе второй задачи, названной мной обратной, состоит в целенаправленном конструировании химического строения молекулы, обладающей наперед заданной пространственной структурой.

Теоретические основы обратной задачи ранее в литературе не рассматривались; по существу этот вопрос даже не ставился, поскольку его постановка приобретает смысл только после решения прямой задачи, т.е. после создания теории свертывания белковой цепи, теории структурной организации белка и соответствующего количественного метода теоретического конформационного анализа, априорно предсказывающего натив-

кое пространственное строение по известному химическому строению молекулы. В настоящее время, я полагаю, необходимые предпосылки есть, возникли условия, сделавшие возможным обращение к обратной задаче. Ее решение выведет исследования многих теоретических и практических проблем на качественно иной уровень, откроет широкие перспективы для количественного изучения атомно-молекулярных механизмов действия природных пептидов и белков в направлении от структуры к функции и создания новых синтетических лекарственных препаратов, а также субстратов, ингибиторов, антител, сделав этот поиск целенаправленным, включающим предварительное теоретическое моделирование. Пока же работы такого плана, количество которых в последние годы стало расти лавинообразно, представляют собой чисто эмпирические исследования, ведущиеся методом проб и ошибок, т.е. в значительной мере вслепую, причем даже в тех случаях, когда используются расчетные методы, в частности методы молекулярной динамики. Это направление, получившее название "дизайна структуры пептидов и белков", обсуждается в следующем, четвертом томе издания "Проблема белка", посвященном структуре и функции. Излагаемые здесь теория и метод решения обратной структурной задачи могут рассматриваться в качестве теоретической и расчетной базы целенаправленных исследований в области дизайна пептидов и белков. В последующем кратком введении рассмотрена та принципиальная роль, которую обратная задача должна сыграть в решении многих, жизненно важных для человека проблем. В частности, речь пойдет о сегодняшних, наиболее насущных проблемах медицины.

Сейчас, как и в прошлом, состояние научной медицины определяется общим уровнем развития естественнонаучных знаний. Достижения физики и химии последних десятилетий привели к почти полному техническому переосмыслению и компьютеризации медицины, существенно изменивших возможности здравоохранения. Разработаны принципиально новые методы диагностики, контроля и лечения различных заболеваний и создано ранее не существовавшее медицинское оборудование. Синтезировано множество новых химических соединений и полимерных материалов, позволивших на их основе конструировать искусственные органы и их отдельные части, а также создавать фильтрующие мембранные системы и приборы, регулирующие и поддерживающие функционирование организма в естественных и экстремальных условиях. Получила развитие трансплантация органов, кровеносных сосудов и тканей. Физика и химия сделали возможным появление микрохирургии, эндохирургии, лазерной терапии и криохирургии.

Все это так, и тем не менее, ни физика и ни химия оказывают прямое воздействие на состояние и развитие научной медицины и определяют ее возможности в лечении заболеваний. Решающая роль, безусловно, принадлежит биологии. Научная медицина по своей сути есть биологическая дисциплина, изучающая с целью приведения к норме патологические процессы жизнедеятельности. Очевидно, возможность решения подобных задач определяется не только знанием тех или иных фактов, явлений и симптомов заболеваний, но и мерой нашего понимания физико-химической

природы соответствующих нормально протекающих процессов и способностью к теоретическому воспроизведению их механизмов на атомно-молекулярном уровне. Иными словами, решение практически всех медицинских проблем напрямую зависит от решения фундаментальных проблем молекулярной биологии, молекулярной генетики и цитологии.

Выдающиеся достижения второй половины XX века в изучении элементарных биосистем, а также становление совершенно новой области знаний – физики нелинейных неравновесных процессов, протекающих в открытых системах и приводящих к спонтанному возникновению порядка из хаоса (физики Пригожина), открыли перед медициной новые горизонты и создали для ее дальнейшего развития высочайший научный потенциал. Все это, в сочетании с резко возросшими техническими возможностями должно было бы привести к взрыву научной мысли и фундаментальным открытиям в медицине, стимулировавшим стремительное развитие здравоохранения. Однако этого не случилось. Быстрых и кардинальных преобразований в научной медицине, по своему масштабу сопоставимых с преобразованиями в биологии и экспериментальной медицине, не произошло. Конечно, не полностью, но в значительной мере новые горизонты и высочайший научный потенциал оказались как бы не востребованными медициной.

Обретение биологией универсального атомно-молекулярного фундамента живого, если судить по конечным результатам, пока не оказало заметного влияния на состояние многих важнейших для человека областей медицины. По-прежнему не найдены радикальные средства лечения многочисленных форм рака и заболеваний сердечно-сосудистой системы. Нет качественных сдвигов в фармакологии. Действия подавляющего большинства современных лекарств слабоизбирательны, отягощены многочисленными нежелательными побочными эффектами и, как правило, направлены не столько на ликвидацию причин заболеваний, сколько на устранение их следствий, более легко наблюдаемых внешних патологических проявлений болезненных симптомов. Любой фармакологический справочник может свидетельствовать о том, что среди великого множества предлагаемых лекарств практически отсутствуют препараты, наделенные абсолютной специфичностью, т.е. оказывающие благотворное воздействие с точностью, присущей, например, многим ферментам, гормонам и рецепторам. Вот уже около 15 лет медики и биологи многих стран пытаются, пока без видимого успеха, найти защиту от вируса иммунодефицита человека или хотя бы приостановить распространение этой чумы XX в. Если и можно говорить о наметившейся тенденции к улучшению, то она связана прежде всего с профилактикой заболевания, а не с его излечением. В чем же причина существенного разрыва между современным уровнем развития биологии и относительно скромным прогрессом научной медицины? Почему наши знания о протекающих в организме человека процессах жизнедеятельности оказываются столь неадекватными нашим возможностям в исправлении этих же процессов при отклонении от нормы? Почему между двумя близкородственными областями знаний (биологией и медициной) так неэффективно

работает механизм трансформации имеющейся информации в практические результаты, представляющие для человека первостепенный интерес? Все ответы на поставленные вопросы сходятся на том, что причины слабой восприимчивости научной медицины к достижениям в изучении живого кроются отнюдь не в ней самой, а в уровне развития современной биологии, прежде всего молекулярной, а если быть более точным, то — в серьезном отставании (или даже отсутствии) теоретической биологии от экспериментальной. Сегодня биология позволяет во многих случаях ответить на вопрос "как?" или на вопрос телеологического характера "для чего?". Однако несмотря на все свои успехи, биология, в отличие от физики и отчасти химии, не стала еще каузальной наукой. В подавляющем большинстве случаев, если речь идет о количественной доказательной трактовке, а не о феноменологическом, правдоподобном объяснении, она затрудняется ответить на вопрос "почему?". Современная молекулярная биология характеризуется наличием существенного разрыва между знанием и пониманием. Ее уровень и господствующая методология с многочисленными корреляционными соотношениями, эмпирическими методами, чрезвычайно упрощенными моделями и гипотетическими описаниями недостаточны для дальнейшего развития познания и решения практически важных, определяющих здоровье и саму жизнь человека вопросов. Для доказательства сказанного кратко остановлюсь на одном конкретном примере. Он касается аспартатных протеиназ, интерес к механизму действия которых особенно возрос в последнее время в связи с обнаружением ферментов этой группы у ретровирусов, вызывающих в организмах человека и животных такие болезни как СПИД, некоторые виды лейкозов, сарком и онкоопухолей молочных желез. Очень важно то обстоятельство, что аспартатные протеиназы ретровирусов играют ключевую роль в их жизненных циклах [358–362]. В клетке-хозяине они гидролизуют белки ядерных капсид, окружающих вирусные РНК, расщепляют полибелковые цепи на зрелые структурные белки и ферменты, участвуют в репликации ретровирусов. Вирусные протеиназы в состоянии также гидролизовать белки инфицированных клеток, нарушая целостность их структурно-функциональной организации. В то же время клеточные протеолитические ферменты не обладают способностью расщеплять вирусные протеиназы и выполнять их функции. Таким образом, в отсутствие протеиназ или при их ингибировании вирусы иммунодефицита человека (HIV-1, HIV-2) и обезьяны (SIV), а также опухолеродные вирусы не смогли бы обрести инфекционные формы. По этой причине протеиназы ретровирусов стали объектами столь пристального внимания энзимологов и медиков.

Аспартатные протеиназы ретровирусов уже через два-три года после их открытия стали одними из наиболее экспериментально изученных ферментов. Основное внимание было уделено протеиназе HIV-1, о структуре и функции которой сейчас известно, пожалуй, больше, чем о таком классическом объекте, как пепсин, открытом еще в 1836 г. Подробно об этом в следующем томе. Сейчас лишь отметим, что стал очевиден один из эффективных и простых путей поиска средств защиты от ретровируса. Он заключается в создании особых ингибиторов аспартатной протеиназы

HIV-1. Практически эта задача оказалась чрезвычайно сложной и на сегодняшний день нерешенной. Среди требований, предъявляемых к свойствам ингибиторов, главное и самое трудновыполнимое касается избирательности их действия. Ингибиторы, обладающие терапевтическим эффектом, должны быть прежде всего высокоспецифичны до такой степени, чтобы дезактивируя ретровирусную протеиназу, не нарушать нормального функционирования как аспартатных, так и других протеолитических ферментов клетки-хозяина. Для целенаправленного поиска ингибиторов, удовлетворяющих этому требованию, необходимо располагать количественными данными о всех стадиях катализа вирусной протеиназы и механизмах функционирования протеиназ инфицированной клетки, а также владеть методом решения обратной структурной задачи, т.е. конструирования химического строения ингибитора по заданной пространственной форме. Вероятность обнаружения таких ингибиторов экспериментальным или эмпирическим путем мала. Помимо того, что этот путь ненадежен, он чрезвычайно дорогостоящ и продолжителен. На несовершенство используемого подхода, допускающего исследование только в направлении от функции к структуре, указывают разработанные схемы катализа аспартатных протеиназ. Они интересны в том отношении, что исходят по существу из одного и того же экспериментального материала, включающего данные рентгеноструктурного анализа и результаты многочисленных биофизических и биохимических исследований, а также базируются на одинаковых традиционных, теоретических представлениях о природе биокатализа. При единстве исходного опытного материала, теоретической основы и в рамках одного подхода были предложены пять различных стереохимических моделей функционирования аспартатных протеиназ, которых, впрочем, могло быть и больше [363–366].

Результаты использования эмпирических и экспериментальных методов в исследованиях аспартатных протеиназ, как и аналогичные результаты исследований химотрипсина, трипсина, карбоксипептидазы, лизоцима и других ферментов [108], дают основание заключить, что появление уникальной количественной опытной информации о пространственном строении белков и их комплексов не привело к концептуальному развитию энзимологии и переосмыслению сложившихся представлений о природе биокатализа. Не изменилась также направленность биокаталитических исследований, по-прежнему следующих от функции к структуре. Это не случайно, поскольку результатом такого подхода может быть лишь знание морфологии белков на атомно-молекулярном уровне, которая сама по себе не является конечной целью изучения элементарных биосистем.

Дальнейшее развитие молекулярной биологии, как и медицинской науки, делает необходимым создание теоретической биологии. Признаками становления последней являются теории структурной и структурно-функциональной организации пептидов и белков, возникновение нового магистрального направления исследований от структуры к функции и, наконец, обратная структурная задача.

19.1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ

Рассматриваемый в этой главе метод решения обратной структурной задачи [26, 367] строится на общих принципах количественной конформационной теории пептидов и белков (см. гл. 2), учете особой роли ближних взаимодействий в пространственной организации эволюционно отобранных аминокислотных последовательностей (см. гл. 5) и на использовании естественной классификации пептидных и пространственных структур (см. гл. 7). Ближние взаимодействия обладают одним, важным для решения обратной структурной задачи свойством, отсутствующим у средних и дальних взаимодействий. Основопологающее положение физической теории структурной организации белков, согласующееся с экспериментом и подтвержденное результатами расчета конкретных объектов, состоит в том, что реализующиеся в биологических условиях у пептидов и белков пространственные формы всех остатков отвечают наиболее выгодным конформациям свободных монопептидов (см., например, рис. II.23 и II.24). Средние и дальние взаимодействия ни в одном случае не вступают в противоречие с требованиями, диктуемыми ближними взаимодействиями. Последние определяют для каждого остатка набор дозволенных для него низкоэнергетических пространственных форм, которые поэтому являются универсальными в отношении последовательности. При свертывании пептидной цепи в нативную структуру только из таких наборов (см. табл. II.17) происходит выбор (вначале под действием средних, а затем дальних взаимодействий) конформационных состояний всех остатков. Специфичной для пространственного строения любого пептида оказывается последовательность конформационных состояний остатков, а не сами состояния. Следовательно, ближние взаимодействия заранее известны. Это обстоятельство позволяет менять и контролируемым образом, сознательно формировать наборы разрешенных для аминокислотных остатков конформационных состояний, или, иными словами, эффективно и целенаправленно воздействовать на пространственную организацию пептидов и белков. Средние и дальние взаимодействия, напротив, всегда уникальны, как и сами аминокислотные последовательности. Они не поддаются прямому целенаправленному, прогнозируемому изменению, результат их варьирования заранее неизвестен и трудно контролируем.

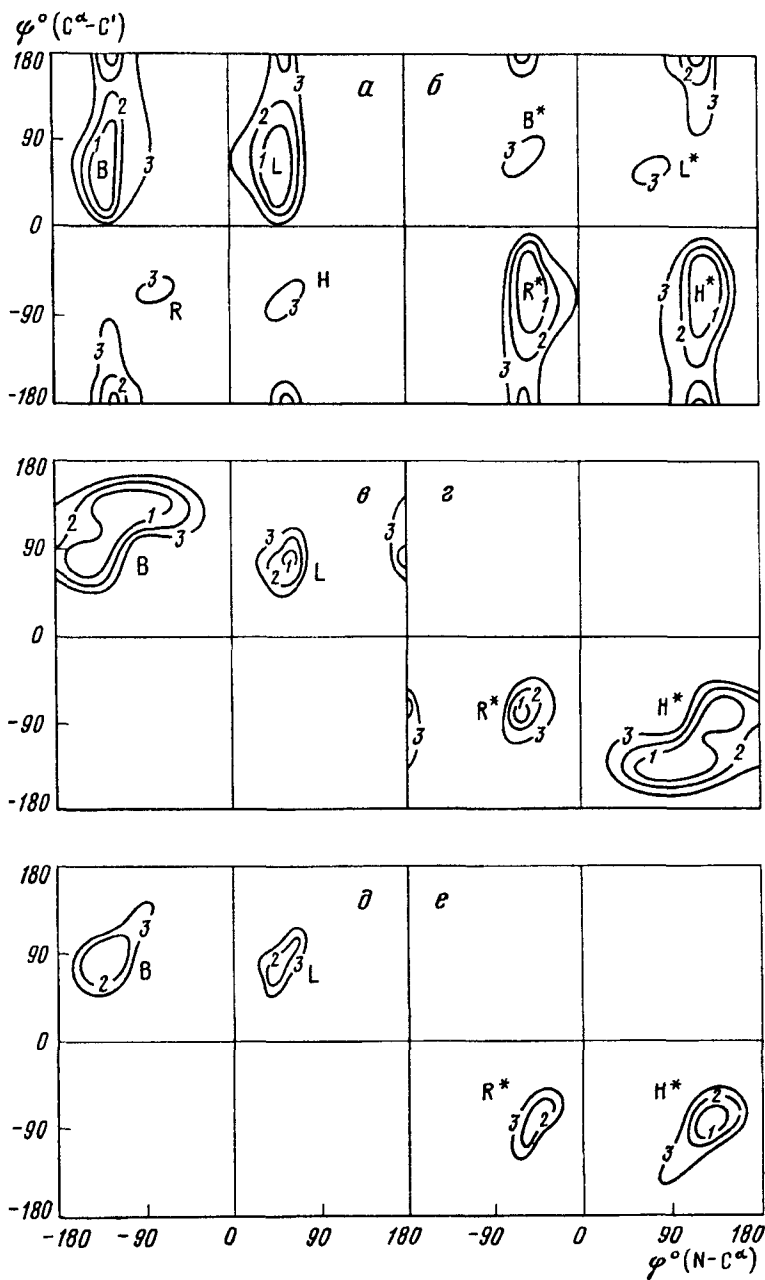
Предсказуемо изменить конформационные возможности пептидов и белков с помощью ближних взаимодействий оказалось нетрудно. Добиться этого можно прежде всего теми же простыми средствами, которые выработались в процессе самой эволюции органического мира. Перечислим некоторые из уже апробированных способов решения конкретных обратных задач: замена в последовательности остатка с *L*-конфигурацией на *D*-изомер; *N*-метилование; замена или модификация боковых цепей остатка; замена аминокислоты на гидроксикислоту.

Иерархический характер классификации пространственного строения пептидов (см. гл. 7) позволяет разделить обратную задачу на три ступени в соответствии с их структурной градацией на шейпы, формы и конформации. Благодаря этому поиск решения задачи может строиться путем последовательной конкретизации искомой пространственной структуры

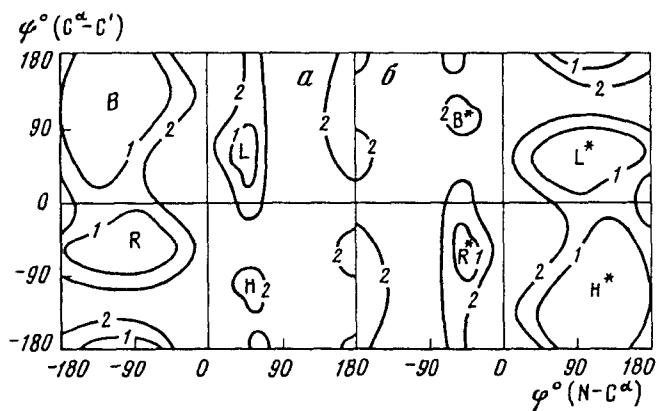
химически модифицированной молекулы. Согласно такой схеме, вначале детерминируется соответствующий шейп пептидного скелета, затем форма основной цепи и, наконец, точная геометрия нужной конформации. Следовательно, на первой ступени решение выражается в символах *e* и *f*, на второй – в символах R, B, L, H и лишь на третьей ступени – в численных значениях конформационных параметров ϕ , ψ , ω или в координатах атомов. Вначале рассмотрим выделение шейпов пептидного скелета путем аминокислотных замен в последовательности L-аминокислот. Для иллюстрации выбран пентапептид, имеющий в общем случае 16 шейпов пептидного скелета. Как не раз отмечалось, включение в цепь остатка пролина приводит к существенному ограничению конформационной свободы предшествующего остатка, делая практически невозможным реализацию у него R-формы (если только остаток, стоящий перед Pro, не является Gly) [368]. Так как пролин может иметь только R- или B-форму, а предшествующий остаток находится в B- или L-форме, то основная цепь C-концевого дипептидного участка [Pro⁵]-пентапептида может принимать формы B-R, B-B, L-R и L-B, относящиеся к развернутому типу (*e*). Замена остатков пентапептида в четвертом, третьем и втором положениях на Pro по той же причине накладывает запрет на свернутые формы у соответствующих дипептидных участков (3-4, 3-2, 1-2). В результате количество возможных шейпов пептидного скелета у монопролинзамещенного пентапептида (за исключением [Pro¹]) сокращается вдвое. Очевидно, что при замене на Pro двух остатков все возможные типы структур пентапептида будут относиться уже только к четырем шейпам. Целенаправленное выделение нужного типа пептидного скелета заменой одного остатка на Pro или путем включения его в соответствующее место последовательности достигается здесь за счет запрещения структурных вариантов многих других типов.

Предсказать заранее все последствия L-аминокислотных замен, в которых не участвует Pro, как правило, невозможно. Можно лишь утверждать, что в данном случае не происходит очевидное элиминирование ни одного типа структур. Это объясняется возможностью реализации у 19 аминокислотных остатков состояний с R-, B- и L-формами основной цепи (исключением является только Pro) и отсутствием стерических напряжений между соседними остатками при всех формах основной цепи шейпов *e* и *f*. Подтверждением сказанному может служить явление гомологии белков, т.е. реализация трехмерных структур одной и той же формы основной цепи у различных, но непременно эволюционно отобранных последовательностей. На примере нейротоксина II (см. гл. 15) показано, что у серии гомологичных белков структуры одной и той же формы основной цепи являются во всех случаях глобальными.

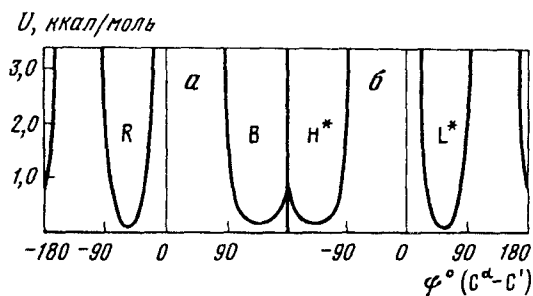
Интересной конформационной спецификой обладают N-метирированные аминокислоты [369]. Приведенные на рис. IV.20 потенциальные поверхности метиламида N-ацетил-N-метил-L-аланина (*a*) и диметиламида N-ацетил-L-аланина (*в*) показывают, что появление метильной группы при азоте радикально сказывается на конформационной свободе основной цепи как собственного, так и предшествующего остатка. Для первого (рис. IV.20,*a*) запрещается область R, а область B становится практически



и с. IV.20. Конформационные карты φ - ψ метиламида N-ацетил-N-метил-L(D)-аланина (а, б), диметиламидов N-ацетил-L(D)-аланина (в, г) и N-ацетил-N-метил-L(D)-аланина (д, е)



Р и с IV.21 Конформационные карты ϕ - ψ метиламидов N-ацетил-L-аланина (а) и -D-аланина (б)



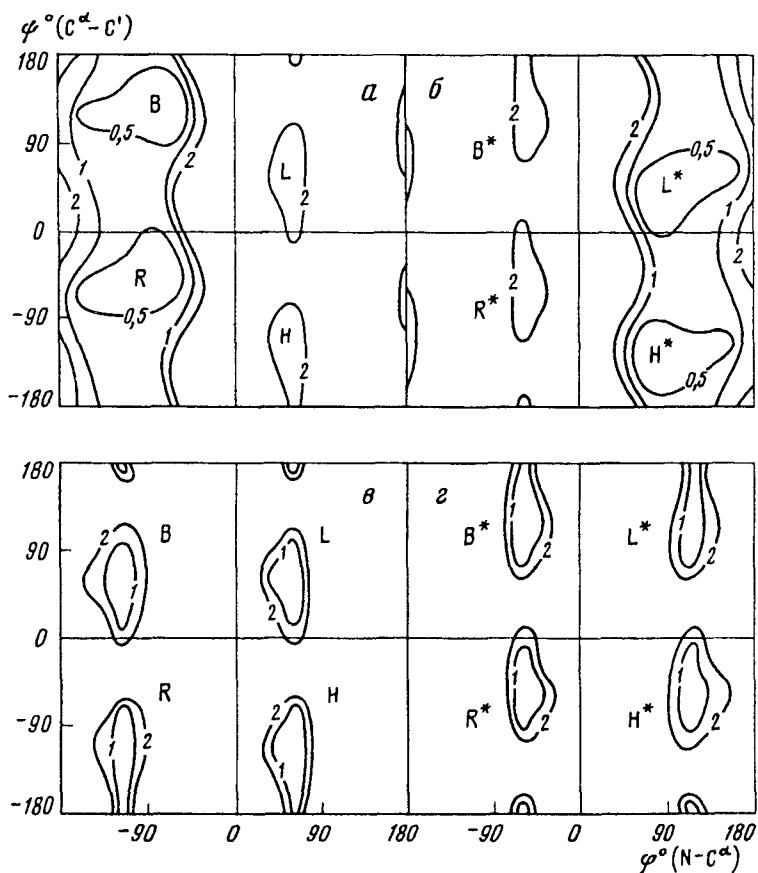
Р и с IV.22 Потенциальные кривые U - ψ метиламидов N-ацетил-L-пролина (а) и -D-пролина (б)

эквивалентной по энергии и по площади области L. Во втором случае (рис. IV.20, в) при метилировании азота основной цепи одного остатка и его предшествующего соседа становятся нереальными все конформации с формой R, а наибольшую вероятность приобретают состояния с формой B. Как и при аналогичном воздействии Pro, причина запрета формы R заключается в наталкивании, возникающем при значениях углов ϕ , ψ в области правой α -спирали и любых значениях угла χ_1 , атомов водорода при атоме C^B i -го остатка на атомы водорода N-метильной группы $(i+1)$ -го остатка N-метил-L-аланина (или на атомы водорода метиленовой группы пролинового цикла). Так как для N-метилированного и предшествующего ему остатков разрешены B- и L-состояния, то основная цепь дипептидного участка может иметь развернутые (B-B, L-B) и свернутые (B-L, L-L) формы. Поэтому введение в цепь N-метилированных L-аминокислот в отличие от Pro не снижает количество подлежащих рассмотрению шейпов пептидного скелета, но резко уменьшает (по крайней мере в 2 раза) набор разрешенных форм основной цепи каждого типа. Из

анализа заведомо исключаются все варианты с R-состоянием двух остатков.

Изменение у свободной α -аминокислоты *L*-конфигурации асимметрического атома C^α на *D*-конфигурацию не влияет на геометрию и конформационную свободу монопептида. На рис. IV.20–IV.22 справа приведены конформационные карты метиламидов *N*-ацетил-*D*-аминокислот, которые идентичны картам соответствующих *L*-изомеров, повернутым на 180° . Если у метиламида *N*-ацетил-*L*-аланина разрешенными являются *R*-, *B*- и *L*-области, то у *D*-аланина – L^* , H^* и R^* , причем потенциальная поверхность *R*-области первого изомера эквивалентна поверхности L^* второго, а *B*-области – H^* и *L*-области – R^* (см. рис. IV.21, а, б). Области *B* и *L* у трех *N*-метильных производных метиламида *N*-ацетил-*L*-аланина полностью отвечают H^* - и R^* -областям соответствующих производных *D*-аланина (см. рис. IV.20). Следовательно, в исходных наборах монопептидных низкоэнергетических состояний структурные варианты *L*- и *D*-остатков одинаковы в отношении ближних взаимодействий и отличаются лишь значениями углов φ , ψ ($\varphi_D = \varphi_L + 180^\circ$; $\psi_D = \psi_L + 180^\circ$). Комбинации форм *L*-остатка (*R*, *B*, *L*) с формами *D*-остатка (L^* , H^* , R^*) приводят как к развернутым ($R-L^*$, $R-H^*$ и т.д.), так и к свернутым ($R-R^*$, $B-H^*$ и т.д.) формам основной цепи дипептидного участка. Поэтому замена остатка в *L*-аминокислотной последовательности на остаток с *D*-конфигурацией не сказывается в общем случае на шейках пептидного скелета. Исключение имеет место лишь при включении в цепь *D*-остатка перед Pro. В этом случае остаток Pro запрещает у предшествующего остатка все конформационные состояния со значениями угла $\psi > 0^\circ$. Соответствующий дипептидный участок, например *D*-Ala-Pro, может иметь формы R^*-R , R^*-B , H^*-R и H^*-B , относящиеся к свернутому типу (f). Таким образом, если у пептида перед Pro находится остаток с *L*-конфигурацией, то для него запрещены все шейки со свернутыми формами основной цепи дипептидного участка; если же предшествующий Pro остаток имеет *D*-конфигурацию, то запрещенными оказываются все шейки с развернутыми формами.

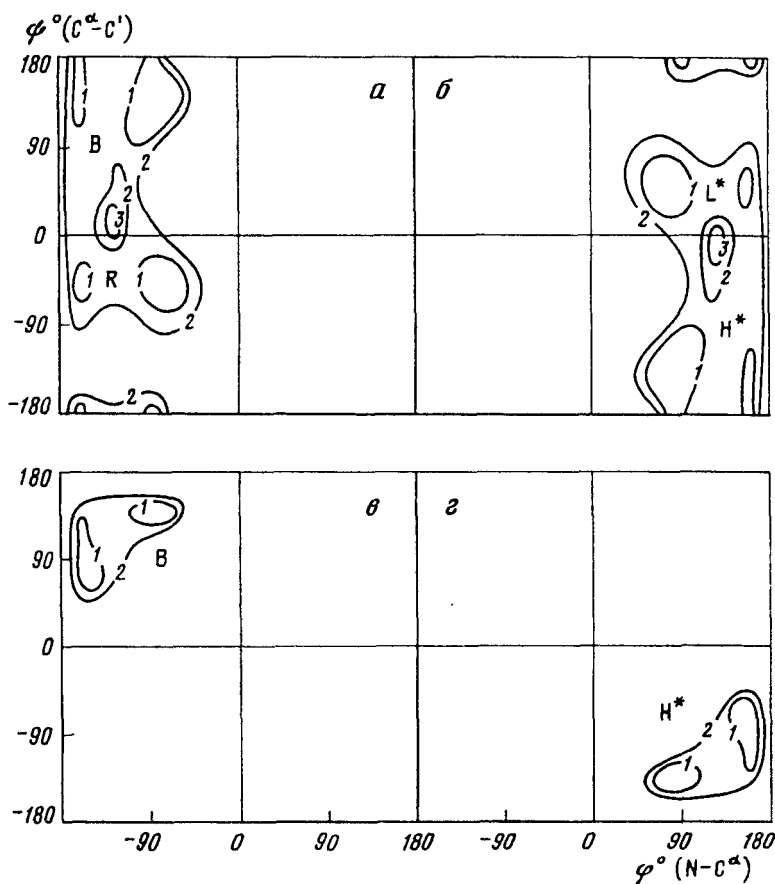
Ряд природных соединений, например избирательно индуцирующих транспорт ионов через мембраны, построен из регулярно чередующихся амино- и гидроксикислотных *L*- и *D*-остатков (антибиотики валиномицин, энниатин, боверицин и др.). Функциональные свойства мембранно-активных молекул в значительной степени определяются конформационными возможностями депсипептидной цепи, которые не полностью адекватны возможностям чисто пептидной цепи с гомогенной асимметрией атомов C^α . Специфика формообразования депсипептидов во многом обусловлена особенностями ближних взаимодействий амино- и гидроксикислотных остатков. На рис. IV.23 приведены конформационные карты метиловых эфиров *N*-ацетил-*L*-аланина (а) и *N*-ацетил-*N*-метил-*L*-аланина (б), которые дают представление о ближних взаимодействиях аминокислотного звена депсипептидной цепи [370, 371]. Потенциальная поверхность дезметильного производного имеет четыре неравновероятных минимума. Разрешенные области в левой части карты (*R* и *B*) значительно глубже и шире,



Р и с. IV.23. Конформационные карты ϕ - ψ метиловых эфиров N-ацетил-*L*(*D*)-аланина (а, б) и *N*-метил-*L*(*D*)-аланина (в, г)

чем в правой (L и H). В отличие от метиламида N-ацетил-*L*-аланина (см. рис. IV.21, а) на карте метилового эфира (см. рис. IV. 23, а) более сглажена потенциальная поверхность перешейка между областями R и B, так что возможны практически все значения угла ψ . У *N*-метилового производного существенно уменьшаются области низкой энергии при $\phi < 0$ (см. рис. IV.23,б); минимумы в левой и правой частях карты становятся приблизительно равновероятными. На конформационной карте метиламида О-ацетил-*L*-молочной кислоты (рис. IV.24,а), имитирующего гидроксикислотное звено депептидной цепи, наиболее предпочтительны конформации R и B; области в правой части карты (L и H) характеризуются высокими значениями энергии и являются запрещенными. Конформационная свобода диметиламида О-ацетил-*L*-молочной кислоты (рис. IV.24,в) ограничена, по существу, только одной областью B.

Таким образом, все конформационные состояния amino- и гидрокси-



Р и с. IV.24. Конформационные карты ϕ - ψ метиламида (а, б) и диметиламида (в, г) О-ацетил-*L*(*D*)-молочной кислоты

кислотных остатков депсипептида, как и у аминокислотной последовательности, описываются с помощью тех же четырех канонических форм R, B, L и H. Различия в конформационной свободе остатков пептидной и депсипептидной цепей касаются числа разрешенных областей, их относительной энергии и размера. Варьирование боковых цепей и N-метилирование в обоих случаях не сопровождается образованием новых областей низкой энергии.

Выше были рассмотрены поддающиеся априорной оценке воздействия на шейки основной цепи: замены остатка на пролин, N-метилирование, изменения *L*-конфигурации остатка на *D*-, замены аминокислоты на гидроксикислоту. Проанализируем теперь влияние тех же факторов на формы основной цепи аминокислотной последовательности. Решение обратной структурной задачи на уровне формы основной цепи и конформации удобно рассматривать (без нарушения общности выводов) на конкретных

примерах. В качестве таковых выбраны аналоги брадикининпотенцирующего пентапептида (БПП₅), пептид δ -сна и ангиотензин II.

19.2. АНАЛОГИ БРАДИКИНИНПОТЕНЦИРУЮЩЕГО ПЕНТАПЕПТИДА

Исходными в решении обратной структурной задачи для природной молекулы БПП₅ ($\text{Glu}^1\text{-Lys}^2\text{-Trp}^3\text{-Ala}^4\text{-Pro}^5$) послужили его формы основной цепи, полученные путем комбинации всех возможных форм структурных вариантов перекрывающихся трипептидов 1–3 и 3–5 (см. гл. 8). При замене у БПП₅ остатка Ala^4 на Pro^4 становятся запрещенными все структуры со свернутой формой на участке 3–4. Но и среди структур разрешенных типов не могут быть реализованы варианты, в которых четвертый остаток пентапептида находится в L-состоянии, а третий – в R-состоянии. В результате из дозволенных для БПП₅ конформаций с 18 различными формами основной цепи 8 типов у синтетического аналога [Pro^4]-БПП₅ можно ожидать реализацию состояний лишь с шестью формами четырех типов пептидного скелета.

Все аминокислотные остатки, за исключением Gly, имеют более объемные боковые цепи, чем Ala. Замена в пептидной цепи молекулы БПП₅ остатка Ala^4 на любой другой остаток, кроме Gly, должна вызывать определенные стерические ограничения и приводить к смещению характерного для природного пентапептида положения конформационного равновесия, каких-либо новых оптимальных состояний, запрещенных для исходной молекулы, при этом появиться не может. Однако поскольку все стандартные остатки, кроме Pro и Gly, имеют сходные конформационные карты ϕ – ψ с разрешенными областями R, B, L, то такая замена не приведет к заведомому исключению из рассмотрения структурных вариантов форм или шейпов пептидного скелета, дозволенных для БПП₅ с Ala^4 . Влияние подобных замен выявляется при учете только средних и дальних взаимодействий, т.е. в расчете конкретных конформационных состояний, а не при полуколичественном рассмотрении форм основной цепи и тем более шейпов. Введение в четвертое положение пентапептида остатка N-MeAla не ограничивает типы пептидного остова, а затрагивает лишь формы. Нереальными становятся те из них, в которых третий и четвертый остатки находятся в R-состоянии (см. рис. IV.20, а, в). Во всех структурах, разрешенных для БПП₅ и его рассмотренных аналогов, C-концевой дипептидный участок может находиться лишь в развернутом состоянии (е). Из 16 шейпов, разрешенных в общем случае для пентапептида, у этих молекул исключается половина со свернутыми формами C-концевого дипептида (f). При замене $L\text{-Ala}^4$ на $D\text{-Ala}^4$ именно запрещенные для БПП₅ типы структур и только они становятся возможными. Следовательно, конформационные состояния молекул БПП₅ и [$D\text{-Ala}^4$]-БПП₅ по форме основной цепи и шейпу полностью альтернативны. Метилирование пептидного азота аминокислотного остатка с L- и D-конфигурацией ограничивает конформационную свободу предшествующего остатка. Невозмож-

ность реализации его в R-состоянии исключает ряд форм основной цепи, не уменьшая, однако, число шейпов.

Проведенное рассмотрение решения обратной структурной задачи на уровне шейпов и форм основной цепи показывает, что даже простейшие химические модификации пептидной последовательности, такие, как единичная аминокислотная замена, N-метилирование и изменение конфигурации асимметрического центра остатка, могут существенно сказаться на конформационных возможностях молекулы. Благодаря исключению из последующего рассмотрения целого ряда типов пептидного остова, а в каждом типе – форм основной цепи и, следовательно, большого числа конформационных состояний, на этом этапе достигается значительное сужение границ поиска нужной структуры. Особенно важно то обстоятельство, что стерические последствия всех отмеченных изменений химического строения, сделанных по отдельности или в комбинации, можно заранее предвидеть при рассмотрении задачи в общем виде. Кроме того, они имеют универсальный характер, т.е. справедливы для любой аминокислотной последовательности. Перейдем теперь к завершающей стадии решения обратной задачи, требующей строгой количественной оценки влияния химических модификаций на конформационные состояния пептида.

В табл. IV.22 приведено энергетическое распределение оптимальных конформаций молекул БПП₅, [Pro⁴]-БПП₅ и [N-MeAla⁴]-БПП₅ в соответствии с их формой и шейпом пептидного скелета [372, 373]. У природного пентапептида доминирующей предпочтительностью обладают конформации двух типов – *fe**fe* и *fffe*. Наибольшие вклады в стабилизацию конформаций первого шейпа с формой основной цепи RBBLR вносят электростатические взаимодействия между ε-аминогруппой Lys и С-концевой карбоксильной группой Pro (~ -7,0 ккал/моль) и дисперсионные взаимодействия алифатической части боковой цепи Lys² с основной цепью фрагмента Ala⁴-Pro⁵ (~ -7,5 ккал/моль). Лучшая конформация шейпа *fffe* с формой RRRBR уступает глобальной ~2,0 ккал/моль. Она компактней последней и в силу этого предпочтительнее по дисперсионным взаимодействиям, но проигрывает ~4,5 ккал/моль по энергии электростатических взаимодействий из-за удаленности боковой цепи Lys от С-концевого участка. Как уже отмечалось, структура типа *fffe* может оказаться самой предпочтительной в сильнополярных средах или при образовании ионных пар с заряженными группами других молекул.

В работе [372] были сопоставлены структуры и конформационные возможности природного пентапептида БПП₅ и ряда его синтетических аналогов с имеющимися экспериментальными данными об их биологической активности. Сопоставление позволило выявить низкоэнергетические конформационные состояния с формами основной цепи RRRBR и RBBLR, актуальные для проявления соответственно ингибирующего и потенцирующего эффектов пентапептида. Сделан вывод, что полифункциональность БПП₅ обусловлена наличием соответствующего числа предпочтительных по энергии конформаций и возможностью смещения равновесия между ними под влиянием внешних условий. В связи с этим становится важным прогнозирование синтетических аналогов, избирательно моделирующих низкоэнергетические конформации природного пептида.

Таблица IV 22

**Распределение конформаций брадикининпотенцирующего пептида БПП₅
и его синтетических аналогов по энергии**

Шейп	Форма	БПП ₅						[Pro ⁴]-БПП ₅						[N-MeAla ⁴]-БПП ₅					
		Интервал энергии $U_{\text{общ}}$, ккал/моль																	
		0–1	1–2	2–3	3–4	4–5	>5	0–1	1–2	2–3	3–4	4–5	>5	0–1	1–2	2–3	3–4	4–5	>5
eeee	BLBBR						12						8						8
	RLRLR						8						–						–
eefe	RLBLR						12						–						6
	RLRBR						12						–						–
efee	RLLBB						8						4						4
feee	BLBBR						83	1	2	10	4	20	47					1	75
	RBRLR						36						–						–
	RRLBR						16			2	8	3	6						32
fefe	RBBLR	2	7	11	6	10	47						–	4	5	5	2	1	21
	RBRBR				2	6	32						–						–
	RRLLR						5						–						16
ffee	RRBBR						48				2	25	58						21
	RRRLR						47						–						–
	RBLBR						5						5						5
effe	RLLLR						4						–						4
	RRBLR						48						–						14
fffe	RRRBR		2		8	11	41						–						–
	RBLLR						5						–						3

Замена остатка Ala⁴ в последовательности БПП₅ на Val⁴ не влияет на химически активные группы, и поэтому различие в биологических свойствах БПП₅ и [Val⁴]-БПП₅ может быть отнесено за счет стерического фактора. Конформационный анализ обеих молекул показал, что такая замена не улучшает ни одну из высокоэнергетических конформаций природного пептида. Все изменения в распределении по величинам энергии структурных вариантов [Val⁴]-БПП₅ по сравнению с БПП₅ коснулись лишь представителей шейпов *fefe* и *fffe*, т.е. самых предпочтительных для исходного соединения состояний. Разрыв в энергии между лучшими конформациями RBBLR (*fefe*) и RRRBR (*fffe*) возрос с 2,0 до 4,1 ккал/моль. Лучшая структура [Val⁴]-БПП₅ с основной цепью RBBLR не только сохранила ориентацию боковых цепей -Lys²- и -Phe³- и близость групп N⁺H₃ и COO⁻, а следовательно, и все характерные для глобальной конформации природного пептида стабилизирующие контакты, но и приобрела ряд дополнительных выгодных взаимодействий боковой цепи Val с остатками Pro и пироглутаминовой кислоты. Структура этого же типа, но другой формы (RBRBR) (см. табл. IV.22) молекулы БПП₅, обладающая невысокой энергией, имеет у [Val⁴]-БПП₅ значительно более высокую энергию вследствие наталкивания боковой цепи Val⁴ на остаток <Glu¹. У структуры с формой RRRBR шейпа *fffe* появление Val делает необходимым переориентацию боковых цепей второго и третьего остатков, сопровождаемую изменениями на десятки градусов углов ϕ , ψ основной цепи. Поэтому можно ожидать у синтетического аналога [Val⁴]-БПП₅ заметное понижение ингибирующей активности по сравнению с природным пептидом БПП₅. В то же время оба соединения не должны существенно отличаться по потенцирующей способности, поскольку при замене остатка в четвертом положении основная для этой функции структура RBBLR остается самой выгодной по энергии, а значения ее конформационных параметров меняются незначительно по сравнению со структурой природной молекулы; наибольшие отклонения (14°) от оптимальных значений претерпевают углы ψ_3 и ψ_4 .

Если поставить задачу о выделении практически в чистом виде структуры с формой основной цепи RBBLR и сохранении из всего спектра активностей только потенцирующей способности пентапептида с пролонгацией его действия в организме, то, по-видимому, нельзя предложить ничего более простого и более эффективного, чем замену у остатка Ala⁴ атома Н при атоме N на метильную группу. Еще до детального конформационного анализа можно утверждать, что соединение [N-MeAla⁴]-БПП₅ не будет обладать ингибирующей активностью, так как ответственная за эту активность форма молекулы RRRBR запрещена. Высокую энергию будут иметь и все другие структуры, у которых третий остаток находится в R-состоянии. В их число не входит ответственная за потенцирование структура RBBLR. Как видно из табл. IV.22, она, действительно, является единственно реальной. В пределах нескольких градусов у глобальных конформаций RBBLR молекул БПП₅ и [N-MeAla⁴]-БПП₅ совпадают значения всех двугранных углов вращения вокруг связей основной и боковых цепей.

Из общих соображений можно полагать, что замена в последовательности БПП₅ Lys² на остаток, лишенный положительного заряда, например на Glu, приведет к обратному эффекту по сравнению с заменой Ala⁴ на Val⁴ или N-MeAla⁴. Детальный конформационный анализ молекулы [Gln²]-БПП₅ [373] показал, что и здесь так же, как у природного пептида и его аналогов, конформационное равновесие описывается структурными вариантами с шейпами пептидного скелета *fefe* и *fffe*. Однако если у БПП₅, [Val⁴]-БПП₅ и [N-MeAla⁴]-БПП₅ равновесие, особенно в последнем случае, смещено в сторону структур типа *fefe*, то у [Gln²]-БПП₅ – в противоположную. У этой молекулы конформация с формой RRRBR (*fffe*) предпочтительнее лучших конформаций типа *fefe* с формами RBBLR и RBRBR соответственно на 4,1 и 4,3 ккал/моль. Резкая дестабилизация при замене Lys² на Gln² структур с шейпом пептидного скелета *fefe* и нивелировка вариантов этого типа, отличающихся формой основной цепи, вызваны ослаблением электростатических взаимодействий, роль которых в стабилизации альтернативных структур свернутого типа *fffe* значительно меньше. Подобное воздействие на устойчивость конформационных состояний окажет также замена лизина на норлейцин, глутаминовую кислоту и треонин. Имеющиеся данные об ингибирующей активности БПП₅ (I₅₀ 0,05 мкг/мл) и его синтетических аналогов [Nle²] – (0,2), [Gln²] – (0,4), [Glu²] – (3,0), [Thr²] – (5,5) свидетельствуют об актуальности для реализации этой активности структуры пентапептида с формой основной цепи RRRBR, а также о большем значении для эффективности действия размера гидрофобной части боковой цепи остатка во втором положении, чем наличия на ее конце положительного заряда [374, 375].

В том случае, если при изучении биологических функций брадикинин-потенцирующих пептидов возникает необходимость в препарате, близком природному пентапептиду БПП₅ по химическому строению, но лишенному его биологических свойств, следует использовать пептид [Pro⁴]-БПП₅. При замене Ala⁴ на Pro⁴ заведомо исключаются все актуальные для функционирования природного пентапептида конформации шейпов *fefe* и *fffe* (см. табл. IV.22). Следующий из расчета вывод об отсутствии у этого аналога как ингибирующей, так и потенцирующей активности полностью подтверждается биологическими испытаниями. При замене остатка в четвертом положении у БПП₅ и [N-MeAla⁴]-БПП₅ соответственно на D-Ala⁴ и D-N-MeAla⁴ действует правило альтернативного запрета. В каждой паре все структуры, разрешенные для молекулы с одной конфигурацией асимметрического центра остатка, запрещены для молекулы с другой конфигурацией. Поэтому очевидно, что пентапептиды с D-Ala⁴ и D-N-MeAla⁴ не будут обладать биологическими свойствами природного соединения. И здесь, как и в случаях БПП₅ и [N-MeAla⁴]-БПП₅, появление метильной группы при атоме азота основной цепи сопровождается резкой энергетической дифференциацией состояний, принадлежащих у незамещенной молекулы к самым предпочтительным. Глобальная конформация [D-Ala⁴]-БПП₅ становится практически единственно возможной у [D-N-MeAla⁴]-БПП₅. Правило альтернативного запрета на структуры

справедливо только при условии, когда за L -остатком, заменяемым на D -изомер, находится Pro. Если этого нет, то такая замена не ведет к заведомому элиминированию каких-либо шейпов пептидного скелета. Тем не менее во многих случаях включение D -аминокислоты, особенно замещенной по атому азота, может оказаться наиболее эффективным способом решения обратной структурной задачи. Это зависит от цели исследования, конкретной последовательности и конформационных возможностей природного пептида. Так, замена L -остатка, находящегося в интересующей нас структуре в состоянии В, на D -остаток всегда приведет к ее запрету. В то же время если заменяемый остаток имеет L -форму основной цепи, то с включением D -остатка вероятность реализации соответствующего конформационного состояния возрастет, поскольку при этом понижается энергия ближних взаимодействий данного остатка и расширяется область разрешенных значений его углов ϕ, ψ , что может привести к установлению более эффективных межостаточных контактов. Большие возможности для целенаправленной детерминации искомой структуры открываются при замещении Gly на L - и D -Ala. При первой замене окажутся запрещенными все конформации, в которых углы ϕ, ψ Gly находятся на стерической карте в области Н, а конформации с углами ϕ, ψ Gly в области L станут менее вероятными. Во-втором случае, т.е. при замене Gly на D -Ala, окажутся невозможными конформации с В-формой Gly, а менее вероятными – с R-формой.

19.3. ПЕПТИД δ -СНА И ЕГО АНАЛОГИ

Пептид δ -сна является одним из многочисленных гормонов мозга. Введение его млекопитающим вызывает у них снижение психической и двигательной активности, замедление сердечных сокращений и дыхания, а также появление некоторых других признаков ортодоксального сна. Своеобразие аминокислотной последовательности этого нонапептида Trp¹-Ala²-Gly³-Gly⁴-Asp⁵-Ala⁶-Ser⁷-Gly⁸-Glu⁹ заключается в том, что ее большая часть состоит из остатков, у которых или вообще отсутствует боковая цепь (Gly³, Gly⁴, Gly⁸), или она незначительна (Ala², Ala⁶, Ser⁷).

Результаты решения прямой структурной задачи приведены в табл. IV.23 [376, 377]. В нее включены девять конформаций различных шейпов пептидного скелета гормона с относительной энергией в интервале 0–10,0 ккал/моль. Для каждой структуры в таблице указаны энергетические составляющие ван-дер-ваальсовых взаимодействий и водородных связей ($U_{\text{вдв}}$), электростатических взаимодействий ($U_{\text{эл}}$) и заторможенного вращения ($U_{\text{торс}}$). Первые две составляющие конформационной энергии приведены отдельно для внутриостаточных, т.е. ближних, и межостаточных – средних взаимодействий. В предпочтительных конформациях δ -пептида геометрия каждого остатка отвечает одному из низкоэнергетических состояний соответствующего свободного монопептида. По этой причине в ряду приведенных структур незначительны по величине и сравнительно постоянны торсионные составляющие. Также консервативны величины

Низкоэнергетические конформации молекулы пептида δ -сна

Номер конформации	Шейп	Конформация	$U_{\text{общ.}}$ ккал/моль	Энергетический вклад, ккал/моль				
				Внутри-остаточные взаимодействия		Межостаточные взаимодействия		$U_{\text{горс}}$
				$U_{\text{вдв}}$	$U_{\text{эл}}$	$U_{\text{вдв}}$	$U_{\text{эл}}$	
I	feffffe	$R_{11}^1 R_{12}^2 H^3 R_{12}^5 R_{31}^7 B_{31}^8 B_{311}^9$	0	-3,8	25,5	-24,8	-15,0	5,5
IIa	eefeeefe	$B_{21} B_{21} B_{21} L B_{21} R B_{32} B_{321}$	1,1	-4,5	24,6	-23,4	-12,1	3,9
IIб		$B_{21} B_{21} R B_{21} R B_{32} B_{321}$	6,9	-4,8	24,6	-21,1	-8,0	3,6
III	ffeffefe	$B_{23} L H R R_{11} B_{21} L B_{321}$	1,3	-4,2	24,6	-22,8	-14,2	5,3
IV	ffefeeefe	$B_{21} L H R B_{11} B_{11} B_{311}$	2,0	-2,9	25,9	-21,4	-17,3	5,1
V	eefeeeee	$B_{21} R H B_{12} B_{22} B_{321}$	3,8	-4,7	25,0	-18,3	-14,5	3,7
VI	seffffe	$R_{21} B_{21} B_{21} H R_{21} R B_{32} B_{321}$	4,5	-3,7	25,1	-25,5	-8,2	4,2
VII	ffeeefeefe	$R_{21} R B_{21} B_{21} R B_{32} B_{321}$	6,5	-3,4	25,0	-20,6	-12,7	5,6
VIII	ffeffefe	$R_{21} R R H R_{21} R B_{32} B_{321}$	7,2	-3,6	25,1	-22,1	-9,2	4,4

$U_{\text{вдв}}$ и особенно $U_{\text{эл}}$ ближних взаимодействий. Наибольшую конформационную чувствительность обнаруживают, естественно, межостаточные средние взаимодействия. Оба вида взаимодействий между остатками имеют стабилизирующий характер. Отметим кратко особенности лучших конформаций шейпов *feffffe* (I) и *eefeeefe* (IIa), имеющих энергию соответственно 0 и 1,1 ккал/моль, а также конформацию типа *seffffe* (VI), которая хотя и обладает большей энергией (4,5 ккал/моль), тем не менее должна рассматриваться как вполне реальная. Для всех стандартных остатков, за исключением Gly, запрещена по ближним взаимодействиям область конформационной карты H. Остаток Gly, напротив, согласно рентгеноструктурным данным белков, часто имеет значения двугранных углов ϕ , ψ в этой области. Если заменить Gly у δ -пептида, например в третьем положении, на L-Ala, то из последующего анализа автоматически могут быть исключены все конформационные состояния, в которых остаток Gly³ имеет H-форму (I, III–V), а при замене на D-Ala – D-форму. В последнем случае запрещенными оказываются структуры IIa, VI и VII. К малореальным могут быть отнесены также структуры IIб и VIII, имеющие Gly в форме R, поскольку при замене Gly на D-Ala происходит дополнительное повышение конформационной энергии, уже достаточно высокой в этих состояниях природной молекулы. Следовательно, исходя из общих соображений набор из девяти низкоэнергетических состояний δ -пептида может быть сокращен у [D-Ala³]-аналога до четырех (I, III–V). Очевидно, что замена остатка Gly на Ala, т.е. на конформационно менее лабильный остаток, не может привести к появлению новых низкоэнергетических структурных типов, отсутствующих в наборе предпочтительных конформаций исходной молекулы. Тем не менее анализ модифициро-

Таблица IV 24

Низкоэнергетические конформации синтетических аналогов молекулы пептида δ -сна

Аналог пептида δ -сна	Номер конформации	Шейп	Конформация	$U_{\text{общ}}$, ккал/моль	Энергетический вклад, ккал/моль				
					Внутриостаточные взаимодействия		Межостаточные взаимодействия		$U_{\text{торс}}$
					$U_{\text{вдв}}$	$U_{\text{эл}}$	$U_{\text{вдв}}$	$U_{\text{эл}}$	
[D-Ala ³]-	IV	ffefefef	B ₂₁ ¹ L ² H ³ R ⁴ B ₁₁ ⁵ B ⁶ R ₁₁ ⁷ B ⁸ B ₁₁ ⁹	0	-3,2	26,3	-22,7	-17,3	5,1
	V	eeefeeeee	B ₂₁ R H B B ₁₂ B B ₂₂ B B ₃₂₁	1,8	-4,7	26,5	-19,5	-14,9	3,6
	VIII	ffefffee	R ₂₁ R R H R ₂₁ R B ₃₂ B B ₃₂₁	7,4	-3,8	25,4	-17,8	-12,5	4,3
[Pro ⁴]-	I	feffffef	R ₁₁ R H R R ₁₂ B R ₃₁ B B ₃₁₁	0	-4,0	24,8	-22,0	-17,0	4,8
	V	eeefeeeee	B ₂₁ R H B B ₁₂ B B ₂₂ B B ₃₂₁	6,0	-2,8	24,3	-21,6	-13,6	6,3
[Pro ⁶]-	IIa	eefefefef	B ₂₁ B B L B ₂₁ R B ₃₂ B B ₃₂₁	0	-4,6	23,5	-20,6	-14,6	3,3
	IIb		B ₂₁ B R B B ₂₁ R B ₃₂ B B ₃₂₁	0,1	-4,8	23,6	-22,6	-12,3	3,2
	IV	ffefefef	B ₂₃ L H R B ₁₁ B R ₃₂ B B ₃₁₁	8,0	-2,7	24,9	-16,5	-16,0	5,2
[Pro ⁷]-	I	feffffef	R ₁₁ R H R R ₁₂ B B ₁₁ B B ₃₂₁	0	-3,6	24,4	-26,4	-17,1	4,5
	V	eeefeeeee	B ₂₁ B H B B ₁₂ B B ₁₁ B B ₃₂₁	8,8	-4,4	24,2	-18,2	-13,9	2,9

ванной последовательности был проведен практически независимо. Для $[D\text{-Ala}^3]$ -аналога, помимо четырех отобранных конформационных состояний δ -пептида (I, III–V), были количественно опробованы также десятки других структурных вариантов.

Расчет показал, что реальными для $[D\text{-Ala}^3]$ -аналога являются две конформации из предполагавшихся четырех, а именно IV и V (табл. IV.24). Значительное повышение энергии структур I и III вызвано наталкиванием метильной группы $D\text{-Ala}^3$ на основную цепь. Снятие этого неблагоприятного контакта сопровождается разрушением многих взаимодействий, стабилизирующих структуры. В то же время в случаях IV и V замена Gly^3 на $D\text{-Ala}^3$ не только не ослабляет ни одного контакта, а даже усиливает некоторые из них. При замене Gly^4 на $L\text{-Pro}^4$ из наиболее низкоэнергетических конформаций δ -пептида остаются лишь I и V: в принципе нельзя исключить структуры IIб и VII, но они значительно менее вероятны; абсолютно нереальны IIа, III, IV, VI и VIII. Последующий расчет показал, что включение Pro в четвертое положение приводит к резкой энергетической дифференциации конформаций. У $[\text{Pro}^4]$ -аналога выделяется фактически единственная, низкоэнергетическая структура шейпа *feffffe* (I), являющаяся глобальной и у природного пептида δ -сна. В связи с этим такая модификация может быть рекомендована для синтеза и биологического изучения. Столь же определенны и не менее интересны результаты решения обратной задачи для двух других аналогов δ -пептида – $[\text{Pro}^6]$ - и $[\text{Pro}^7]$ -.

При замене Ala^6 на Pro^6 запрещаются конформации I, III, VI и VIII, так как предшествующий остаток находится у них в R-состоянии. Заметно возрастает энергия конформаций IV и V из-за фиксации двугранного угла ϕ_6 при -60° , при включении в цепь Pro в оптимальных структурах δ -пептида ϕ_6 имеет значения -105° (IV) и -127° (V). Изменение угла ϕ_6 на десятки градусов в случае Pro^6 сопровождается увеличением расстояния между заряженными группами Trp^1 , Asp^5 , Glu^9 и, как следствие, ослаблением электростатических взаимодействий (на ~ 5 ккал/моль у IV и на ~ 4 ккал/моль у V). Кроме того, вынужденная деформация основной цепи на центральном участке последовательности нарушает согласованность целого ряда стабилизирующих, дисперсионных контактов. Реальными и равновероятными у $[\text{Pro}^6]$ -аналога являются лишь две конформации (IIа и IIб) одного структурного типа (*eeefeefe*), но с разными формами основной цепи. У природной молекулы их абсолютная конформационная энергия существенно отличается ($-11,5$ ккал/моль у IIа и $-5,7$ ккал/моль у IIб), а у $[\text{Pro}^6]$ -аналога совпадает ($-13,0$ ккал/моль). Суммарный эффект межостаточных взаимодействий в структуре IIа остается тем же (повышение стабильности на $1,5$ ккал/моль вызвано внутриостаточными, ближними взаимодействиями). Наибольшие изменения произошли со структурой IIб. Введение Pro значительно деформировало форму основной цепи, уменьшив тем самым энергию электростатических взаимодействий ($\sim 3,5$ ккал/моль), не создавая при этом каких-либо неблагоприятных контактов. Также понизилась на $\sim 2,5$ ккал/моль энергия дисперсионных взаимодействий за счет образования новых контактов с боковой цепью Pro^6 . В результате стабильность конформаций IIб сравнялась с IIа.

При введении Pro⁷ вместо Ser⁷ образуется такая последовательность у которой из всего набора в принципе вероятных для нее пространственных форм (I, III–V) низкой энергией обладает лишь одно конформационное состояние (I) шейпа *fefffe*. Сопоставление его геометрических параметров с параметрами этого же состояния молекулы природного δ-пептида убедительно свидетельствует о стерической комплементарности замены Ser⁷ на Pro⁷ (как и замены Gly⁴ на Pro⁴). В то же время включение Pro в структуры III–V неизбежно сопровождается большим изменением угла φ, с –114° (III), –158° (IV) и –138° (V) до –60°, в результате чего геометрия этих структур значительно отклоняется от соответствующих оптимальных форм δ-пептида и разрушается вся система стабилизирующих дисперсионных и электростатических взаимодействий. В случае конформации I этого не происходит. Более того, у [Pro⁷]-аналога такая структура на 5,5 ккал/моль более стабильна, чем у δ-пептида. Детерминация той же структуры с практически совпадающими значениями всех двугранных углов имеет место, как отмечалось, и у другого аналога δ-пептида – [Pro⁴]-. При изучении биологических свойств гормона обе модификации ([Pro⁴]- и [Pro⁷]-) могут представить большой самостоятельный интерес. Первый аналог, сохраняющий все функциональные группы природной молекулы, полезен для идентификации и исследования той биологической активности δ-пептида, за которую ответственна конформация (I). Привлечение второго аналога поможет выяснить роль боковой цепи Ser⁷ в реализации этой активности. Кроме того, структуры (I), одинаковые у δ-пептида, [Pro⁴]- и [Pro⁷]-аналогов по геометрии оптимальных форм, отличаются по своим динамическим конформационным свойствам (особенно [Pro⁴]-), поскольку имеют разную абсолютную энергию внутримолекулярной стабилизации (соответственно –12,5; –13,4 и –17,2 ккал/моль).

До сих пор при решении обратной структурной задачи были использованы такие аминокислотные замены, воздействие которых на конформационные возможности молекулы легко поддавалось априорной оценке, во всяком случае на уровне формы основной цепи и шейла. Строгий количественный анализ требовался лишь для определения порядка расположения конформационных состояний по величинам энергии в узком ряду отобранных вариантов. Поскольку стандартные аминокислотные остатки, кроме Gly и Pro, имеют сходные конформационные карты ϕ - ψ с разреженными областями R, B и L, то все замены, не касающиеся указанных двух остатков, не ведут к априорному исключению каких-либо форм и шейпов пептидного скелета. Влияние таких замен на конформационные возможности зависит не столько от ближних, сколько от средних и дальних взаимодействий, т.е. от сложной системы внутримолекулярных контактов, определяемой не отдельными остатками, а всей последовательностью. Поскольку в каждом случае ситуация уникальна, то выявить последствия замен даже в отношении форм и шейпов пока можно только расчетным путем. При этом целесообразно руководствоваться следующими соображениями. Включение остатка с более объемной боковой цепью, например замена Ala на Val, всегда вызывает стерические ограничения и приводит к смещению положения конформационного равновесия, характерного для соответствующего природного пептида. Его низкоэнергети-

ческие конформации могут служить для модифицированной последовательности набором исходных для минимизации структурных вариантов. Следующим объектом рассмотрения будет аналог δ -пептида, в котором остатки Ala^2 и Gly^8 замещены на Val^2 и Val^8 (табл. IV.25). Можно было ожидать, что включение в последовательность сразу двух остатков с объемными и негибкими боковыми цепями существенно изменит энергетическое распределение конформаций природного нонапептида. Однако до расчета трудно было предположить, что глобальной структурой модифицированной последовательности станет конформация (VIII), имеющая в выделенном для δ -пептида ряду самую высокую энергию. Оказалось, что оба остатка Val хорошо вписываются только в структуру VIII, не изменяя ее геометрию и не разрушая сложившуюся систему взаимодействий. Напротив, стабильность этой структуры у $[\text{Val}^{2,8}]$ -аналога возрастает по сравнению с δ -пептидом на 8 ккал/моль. Включение же остатков Val в самые лучшие конформации гормона I, IIa, III, IV дестабилизирует их. Например, в случае (I) конформационная энергия повышается на 3,5 ккал/моль.

Модификация δ -пептидной последовательности – замена Asp^5 на Asn^5 – самая незначительная в стерическом отношении, но весьма существенная в электронном. Она делает реальными для $[\text{Asn}^5]$ -аналога структуры лишь одного типа – *eefefee*, среди которых доминирует конформация IIa. Как показывает расчет, в этом случае изменения касаются только двух межостаточных взаимодействий, а именно контактов Asn^5 с Glu^9 и с Tyr^1 . Отсутствие отрицательного заряда у остатка в пятом положении, являющегося центральным в структуре IIa, снимает электростатическое отталкивание между остатками первой пары (с +6,8 ккал/моль у δ -пептида до +0,2 у $[\text{Asn}^5]$ -аналога). Одновременно, правда, пропадает стабилизирующее полярное взаимодействие между остатками второй пары, которое, однако, у δ -пептида в конформации IIa значительно менее эффективно (–3,0 ккал/моль). Из сопоставления соответствующих данных табл. IV 23 и IV.25 можно видеть, что понижение конформационной энергии IIa с –11,5 ккал/моль у δ -пептида до –17,5 ккал/моль у $[\text{Asn}^5]$ - δ -пептида обусловлено главным образом электростатической стабилизацией. Подобный эффект имеет место и в конформации (I), хотя выигрыш здесь составляет только –2,4 ккал/моль. Кроме того, в конформации (I) боковая цепь Asn^5 не может быть ориентирована так же, как Asp^5 в молекуле природного гормона. Вынужденное изменение угла χ_1 с ~60 до ~180° сопровождается ослаблением дисперсионных взаимодействий Asn^5 с Ala^2 и Gly^3 по сравнению с Asp^5 приблизительно на 3,0 ккал/моль. Если у δ -пептида абсолютная энергия конформации (I) равна –12,6 ккал/моль, то у его $[\text{Asn}^5]$ -аналога она составляет –10,8 ккал/моль.

$[\text{Asn}^5]$ -аналог и рассмотренный до него $[\text{Pro}^6]$ -аналог могут быть рекомендованы для изучения биологической активности природного соединения, за которую ответственна конформация шейпы *eefefee*, т.е. для изучения иной части спектра биологического действия гормона, чем при использовании $[D\text{-Ala}^2]$ -, $[\text{Pro}^4]$ - и $[\text{Pro}^7]$ -аналогов. Молекула $[\text{Pro}^6]$ -аналога имеет практически в чистом виде структуру типа *eefefee* при сохранении всех химически активных групп природного нонапептида. У молекулы

Таблица IV 25

Низкоэнергетические конформации синтетических аналогов молекулы пептида δ -сна

Аналог пептида δ -сна	Номер конформации	Шейп	Конформация	$U_{\text{общ}}$ ккал/моль	Энергетический вклад, ккал/моль				
					Внутриостаточные взаимодействия		Межостаточные взаимодействия		$U_{\text{торс}}$
					$U_{\text{вдв}}$	$U_{\text{эл}}$	$U_{\text{вдв}}$	$U_{\text{эл}}$	
[Val ^{2,8}]-	VIII	<i>ffefffee</i>	$R_{21}^1 R_{21}^2 R_{21}^3 H^4 R_{21}^5 R_{32}^6 R_{32}^7 B_{32}^8 B_{32}^9$	0	-3,4	25,5	-28,2	-11,7	4,5
	IIa	<i>eeefee</i>	$B_{21} B B L B_{21} R B_{32} B B_{321}$	2,5	-4,2	24,9	-27,4	-8,4	4,2
	IIб		$B_{21} B R B B_{21} R B_{32} B B_{321}$	5,4	-4,3	25,0	-25,4	-6,8	3,6
	I	<i>fefffe</i>	$R_{11} R H R R_{12} B R_{31} B B_{311}$	4,2	-2,5	25,9	-23,4	-16,1	7,0
	VI	<i>feffff</i>	$R_{21} B B H R_{12} R B_{32} B B_{321}$	4,2	-3,8	25,5	-28,6	-9,5	7,3
	VII	<i>ffeeefee</i>	$R_{21} R B B B_{21} R B_{32} B B_{321}$	5,5	-3,2	25,3	-22,6	-12,7	5,5
	IIa	<i>eeefee</i>	$B_{21} B B L B_{23} R B_{32} B B_{321}$	0	-4,4	22,3	-23,5	-15,8	3,9
[Asn ⁵]-	IIб		$B_{21} B R B B_{23} R B_{32} B B_{321}$	2,3	-4,6	22,3	-23,1	-13,4	3,6
	VI	<i>feffff</i>	$B_{21} B B H R_{21} R B_{32} B B_{321}$	6,5	-3,8	23,0	-24,6	-10,3	4,7
	I	<i>fefffe</i>	$R_{11} R H R R_{21} B R_{31} B B_{311}$	6,7	-2,8	23,6	-21,6	-15,5	5,5
	V	<i>eefeeee</i>	$B_{21} R H B B_{11} B B_{32} B B_{121}$	6,7	-4,9	22,1	-16,7	-15,7	4,3
	VIII	<i>ffefffee</i>	$R_{21} R H R R_{21} R B_{32} B B_{321}$	7,5	-3,5	22,7	-20,9	-12,6	4,3

[Asn⁵]-δ-пептида реализуется точно та же структура (различия в углах φ, ψ, ω и χ не превышают в конформациях (IIa) трех соединений нескольких градусов), но при отсутствии одной заряженной группы, играющей, быть может, важную роль в биологическом действии. Результаты расчета, однако, предупреждают об опасности поспешных выводов на этот счет, но позволяют корректно сформулировать задачу физиологического исследования. Модификация с заменой Asp⁵ на Asn⁵, действительно, может помочь оценить влияние отрицательно заряженного остатка в пятом положении, но не вообще на физиологическую активность δ-пептида (такая постановка вопроса в свете нашего рассмотрения не имеет смысла), а лишь на то конкретное гормональное действие, для которого актуальна конформация (IIa). Полезные в этом плане сведения будут получены, естественно, только при использовании [Asn⁵]-аналога для изучения именно данной активности.

19.4. АНАЛОГИ АНГИОТЕНЗИНА II

В гл. 9 были рассмотрены результаты теоретического анализа ангиотензина II (АТ II), Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Val⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸ [378]. Исследование конформационных возможностей октапептидного гормона позволило установить его структурную организацию и тем самым определить набор низкоэнергетических пространственных форм, потенциально являющихся биологически активными. Следующая задача заключается в выявлении в найденном наборе оптимальных конформаций структур АТ II, актуальных для реализации гормональной активности, и определения конкретных связей между ними и функциями. Это тема следующего, четвертого, тома издания "Проблема белка". Здесь же на примере главным образом АТ II только отметим некоторые причины, сдерживающие установление принципов структурно-функциональной организации гормонов, а также покажем, что достижение цели немыслимо без решения обратной структурной задачи.

Ангиотензин II – основной действующий элемент ренин-ангиотензиновой системы, регулирующий водно-солевой обмен в организме млекопитающих. Общий эффект, производимый пептидом широкого спектра действия в организме, складывается из суммы разнообразных откликов, характер которых зависит от органов и тканей, на которые действует гормон. Имеющийся экспериментальный материал свидетельствует о том, что АТ II, как и большинство других гормонов, полифункционален. Малая изученность рецепторов пептидных гормонов, являющихся, как правило, интегральными мембранными белками, оставляет нерешенным вопрос о причине полифункциональности пептидных гормонов. Согласно одной точке зрения способность гормона стимулировать различные процессы в разных частях организма объясняется наличием нескольких специфических для данного гормона рецепторных белков, согласно другой – каждый гормон образует комплекс только с одним специфическим рецептором и, следовательно, вызывает всегда одно и то же аллостерическое изменение его конформации. В этом случае полифункциональность гормона объясняется уже не спецификой гормон-рецепторных взаимодействий, а осо-

бенностями систем, принимающих посылаемый сигнал. Естественно допустить возможность существования механизмов, отвечающих обоим трактовкам гормон-рецепторных взаимодействий.

Большое количество полученных в последние годы экспериментальных данных свидетельствует в пользу гетерогенности рецепторов АТ II, и в дальнейшем изложении будем исходить именно из этого предположения [379–382]. Полифункциональность АТ II и гетерогенность его рецепторов можно связать с молекулярной структурной организацией гормона, изученной теоретически. Его предрасположенность к реализации ряда функций проявляется в существовании в нативных условиях нескольких близких по энергии и легко переходящих друг в друга пространственных форм. Высокая эффективность и строгая избирательность взаимодействий АТ II с различными рецепторами связаны с тем, что каждая его функция реализуется посредством актуальной только для данного рецептора конформации из состава самых предпочтительных структур свободной молекулы. Таким образом, поиск структурно-функциональной организации АТ II сводится к выяснению для каждой биологической активности пептида актуальной конформации. Для решения задачи в условиях отсутствия необходимых данных о потенциальных поверхностях мест связывания требуется использование дополнительной информации. В качестве такой информации, как правило, привлекаются данные по биологической активности синтетических аналогов природных пептидов. Однако при формировании серии аналогов без предварительного изучения конформационных возможностей как природного пептида, так и его искусственных аналогов в ходе исследования по существу случайным образом ищется прямая зависимость между отдельными остатками аминокислотной последовательности гормона и его функциями. Поскольку стимулированные гормоном аллостерические эффекты возникают в результате не точечных, а множественных контактов между комплементарными друг другу потенциальными поверхностями лиганда и рецептора (иначе отсутствовала бы избирательность гормональных действий), нарушение функции при замене даже одного остатка может быть следствием ряда причин. К ним относятся исчезновение нужной функциональной группы, потеря необходимых динамических свойств актуальной конформации, запрещение последней из-за возникающих при замене остатков стерических напряжений, смещение конформационного равновесия из-за изменившихся условий взаимодействия с окружением и т.д. Следовательно, случайная замена отдельных остатков не приводит к решению задачи структурно-функциональной организации гормонов. Об этом свидетельствует отсутствие в течение нескольких десятков лет заметного прогресса в ведущихся с привлечением множества синтетических аналогов исследованиях зависимости между структурой и функцией АТ II, энкефалинов и эндорфинов, брадикининпотенцирующих пептидов, а также ряда других. Отсюда следует неизбежный вывод о необходимости привлечения к изучению структурно-функциональных отношений у пептидных гормонов специального подхода, который позволил бы отойти от метода проб и ошибок и при поиске синтетических аналогов делать сознательный выбор для их синтеза и биологических испытаний.

Рассмотрим в этой связи работу Г.В. Никифоровича и соавт. [383], в которой предпринята попытка идентифицировать биологически активные конформационные состояния АТ II, используя наряду с опытными данными результаты теоретического анализа. Предполагаются известными конформационные возможности молекул гормона и двух видов его аналогов: $A_1, A_2, \dots, A_n$, имеющих высокое сродство к определенному рецептору, и $B_1, B_2, \dots, B_n$, являющихся неактивными. Авторы полагают, что конформации, присутствующие в наборах низкоэнергетических состояний гормона и аналогов $A_1, A_2, \dots, A_n$ и отсутствующие в наборах аналогов $B_1, B_2, \dots, B_n$, относятся к биологически активным структурам АТ II. При реализации такого подхода были использованы три синтетических аналога, имеющих высокое сродство, и один аналог, не обладающий сродством к рецептору гладкомышечной ткани крысы. Расчет, однако, показал, что среди найденных конформаций АТ II и трех его активных аналогов нет структур, которые хотя бы фрагментарно совпадали между собой. Отсутствие совпадения свидетельствовало лишь о некорректности анализа АТ II, о чем уже писалось в гл. 14. Однако авторы работы [383], не ставя под сомнение результаты своих расчетов, сделали, с моей точки зрения, неверный шаг. Они отказались от принципа комплементарности потенциальных поверхностей гормона и рецептора и посчитали, что для образования продуктивного комплекса достаточно точечного соответствия. Для отбора конформаций были учтены всего два расстояния, причем с вариациями в широких интервалах между атомом C^β остатка Val³ и атомами C^β остатков His⁶(4,2–6,2 Å) и Pro⁷(6,7–8,2 Å).

Выбранный критерий крайне неэффективен, так как ему могут удовлетворять десятки совершенно различных структур АТ II, различающихся как формой основной цепи, так и ориентациями боковых цепей. В указанные интервалы межатомных расстояний попадает, в частности, одна из наиболее предпочтительных конформаций рассчитанного Т.В. Гогитидзе и автором данной монографии [384] и обсуждаемого ниже [Pro²]-АТ II – аналога, сродство которого к рецепторам гладкомышечной ткани составляет всего 0,7% сродства природного пептида. Но дело не только в выборе более надежного критерия отбора конформации. Задача осталась бы нерешенной даже и в том случае, если бы была обнаружена общность в наборах низкоэнергетических конформационных состояний АТ II и его активных синтетических аналогов, что непременно должно было бы наблюдаться при правильном решении прямой структурной задачи. Привлечение теоретического конформационного анализа в отсутствие информации о рецепторах и при случайном выборе аналогов не решает задачу структурно-функциональной организации природного пептида.

С учетом полифункциональности АТ II и гетерогенности его рецепторов связь между низкоэнергетическими конформациями и функциями гормона могут быть установлены с помощью небольшой серии синтетических аналогов в том случае, если каждое соединение этой серии будет принимать только одно состояние из набора предпочтительных конформаций природного пептида. Тогда все аналоги будут иметь возможность реализовать только по одной гормональной функции или, точнее, воспроизводить вза-

действие гормона только с одним рецептором. При монофункциональности каждого аналога лишь их совокупность сможет передать весь спектр биологических активностей природного пептида. По сравнению с прямой структурной задачей (априорным расчетом конформаций по известной аминокислотной последовательности) возникающая здесь задача противоположна по своей постановке. Она заключается в теоретическом предельном химической модификации аминокислотной последовательности гормона, необходимой для выделения актуальной для соответствующей функции природного пептида конформации и запрещения других. Иными словами, речь идет о целенаправленном конструировании химического строения синтетических аналогов, каждый из которых заведомо принимает пространственное строение, необходимое для реализации определенной функции при сохранении потенциально активных участков.

Рассмотрим результаты решения обратной структурной задачи для АТ II. В табл. IV.26 сопоставлены величины относительной энергии взаимодействий валентно-несвязанных атомов в предпочтительных низкоэнергетических конформациях самого гормона и его природных и синтетических аналогов. Напомним, что главные цели данного исследования заключались в апробации концепции гетерогенности ангиотензиновых рецепторов [378, 385] и идентификации на основе предложенного в работе [367] подхода конформаций гормона, ответственных за определенные функции. И в том, и в другом случае действия были ограничены имеющимся экспериментальным материалом. Поэтому при формировании серии аналогов нельзя было быть в полной мере последовательным в соблюдении одного важного правила методологии аминокислотных замен: прежде всего производить такие модификации аминокислотной последовательности, которые влияли бы на конформационные возможности пептидной молекулы, но не затрагивали ее химически активных функциональных групп. Замену последних целесообразно проводить на втором этапе исследования, когда уже известны биологически активные конформации гормона и встает вопрос о роли боковых цепей аминокислотных остатков и механизме взаимодействия с рецептором.

Исходными в решении обратной задачи являются, с одной стороны, аминокислотная последовательность гормона и, следовательно, его конформационные возможности, а с другой – спектр биологического действия гормона и количественные оценки активности каждой функции. После определения минимально необходимого набора синтетических аналогов для каждого из них также обязательны столь же исчерпывающие биологические испытания. В работе [384] авторы опирались на имеющийся в литературе экспериментальный материал. Хотя для АТ II он наиболее обширен, тем не менее и здесь ощущается недостаток опытных фактов, касающихся биологических испытаний синтетических аналогов. Последние, как правило, протестированы лишь по одной функции, а поэтому остаются неизвестными очень важные полные спектры их биологических активностей. Наличие таких данных позволило бы значительно расширить результаты исследования и углубить их понимание.

Относительная энергия низкоэнергетических конформаций природных ангиотензинов (АТ I–АТ II) и синтетических аналогов АТ II

Группа конформации	Номер конформации	Шейп	Относительная энергия конформации ($U_{\text{общ}}$, ккал/моль)					
			АТ II	[Asn ¹]-АТ II	АТ III	АТ I	АТ II- (1-6)-пеп- тид	
A	1	<i>fe</i> —	<i>ef</i>	0	4,4	7,4	0,8	2,6
	2	<i>ff</i> —	<i>fef</i> — <i>ef</i>	0,9	0	1,2	0	} 2,8
	3	<i>ff</i> —	<i>ee</i>	3,5	3,4	5,1	7,9	
	4	<i>fe</i> —	<i>ee</i>	4,0	8,5	7,3	3,0	2,6
B	1	<i>ff</i> —	<i>ee</i>	3,5	5,3	4,1	9,9	3,6
	2	<i>ee</i> —	<i>ee</i>	3,7	2,5	} 1,8	9,6	0
	3	<i>fe</i> —	<i>fee</i> — <i>ee</i>	4,4	2,6		—	0,8
	4	<i>ee</i> —	<i>ef</i>	4,6	2,7	} 0	7,5	0
	5	<i>fe</i> —	<i>ef</i>	6,0	3,2		8,3	0,8
	6	<i>ef</i> —	<i>ee</i>	7,0	8,0	4,1	—	5,6
C	1	<i>ff-efe-ee</i>	7,5	—	9,5	—	5,8	
D	1	<i>fe-fff-ef</i>	7,8	9,8	5,3	5,4	2,7	
E	1	<i>fe-eee-ee</i>	7,8	—	9,0	—	5,6	
F	1	<i>fe-eff-ef</i>	8,0	4,8	4,0	7,6	5,1	

Решение обратной структурной задачи для АТ II строится на основе известного из работы [378] набора предпочтительных по энергии конформаций природной молекулы. Расчет показал, что структурная организация октапептидного гормона может быть представлена ограниченным числом низкоэнергетических и легко переходящих друг в друга конформаций, которые в зависимости от геометрии центрального тетрапептидного фрагмента Val³–His⁶ распадаются на две группы (см. табл. IV.26). В одной из них (А) основная цепь тетрапептидного участка имеет структуру типа *fef*, а в другой (В) – типа *fee*. В каждой группе конформации отличаются друг от друга состояниями N- и C-концевых дипептидов и в свою очередь могут быть разделены на структуры со свободной боковой цепью остатка Asp или Arg. В интервал 0–8,0 ккал/моль входят четыре конформации группы А, в том числе наиболее выгодная по энергии ($U_{\text{общ}}$ – 0 ккал/моль), и

Относительная энергия конформации ($U_{\text{общ}}$, ккал/моль)

[Pro ³]- -AT II	[Pro ⁵]- -AT II	[Ala ³]- -AT II	[Ala ⁵]- -AT II	[Pro ²]- -AT II	[Ala ⁸]- -AT II	[Leu ⁸]- -AT II	[Val ⁸]- -AT II	[Ile ⁸]- -AT II	[Tyr ⁸]- -AT II
0	0	0	0	—	0	0	0	1,3	0
—	0	0,6	0,9	—	1,3	2,0	2,3	4,0	0
—	8,8	2,7	4,6	—	4,7	1,5	4,9	0	3,8
4,5	1,8	3,5	4,8	—	3,4	0,3	5,0	0,2	3,6
—	6,4	4,3	4,9	—	6,2	4,6	5,4	1,3	3,0
—	6,5	5,8	7,4	4,6	6,5	5,7	7,4	5,1	3,8
—	—	3,8	5,5	—	5,7	2,8	6,2	3,7	5,5
—	—	5,8	7,4	9,5	6,5	6,3	4,9	7,9	6,2
—	—	5,4	7,0	—	5,8	4,9	2,8	6,0	8,9
—	6,5	7,5	7,4	0	9,3	6,1	5,7	5,4	7,7
—	—	10,0	7,5	—	7,6	4,1	3,7	4,2	7,1
—	—	8,8	9,0	—	8,0	9,1	2,6	—	7,0
—	7,4	7,3	7,7	—	8,2	4,5	3,8	4,0	7,3
—	—	7,9	7,8	0,8	8,0	8,9	5,5	5,0	7,6

шесть конформаций группы В, самая предпочтительная из которых обладает энергией 3,5 ккал/моль. В высокоэнергетическую часть этого интервала (7,5–8,0 ккал/моль), кроме того, попали еще четыре конформации, имеющие на центральном участке Val³–His⁶ отличные от А и В шейпы основной цепи (*efe*, *fff*, *eee* и *eff*).

В организмах млекопитающих АТ II встречается в двух разновидностях, различающихся аминокислотным остатком в первом положении, но одинаковых по биологической активности. Из табл. IV.26 видно, что по конформационным возможностям [Asn¹]-аналог схож с нативным гормоном. Следует отметить лишь смену глобальной конформации в группе А. В молекуле [Asp¹]-АТ II наименьшую энергию имеет конформация А₁. В ее стабилизацию существенный вклад вносит остаток Arg², гидрофобная часть боковой цепи которого осуществляет эффективные дисперсионные

взаимодействия почти со всеми остатками фрагмента Val³-Pro⁷ (~11,5 ккал/моль), а гуанидиновая группа, имеющая целочисленный положительный заряд, – также и с С-концевым остатком Phe⁸, заряженным отрицательно (–2,9 ккал/моль). Остаток аспарагиновой кислоты практически не взаимодействует с остальной частью молекулы и ориентирован в окружающую среду. В конформации A₂, энергия которой (0,9 ккал/моль) лишь незначительно превышает энергию A₁, ситуация меняется: свободной оказывается боковая цепь остатка Arg², а связанной – Asp¹. В молекуле [Asn¹]-АТ II в отличие от [Asp¹]-АТ II отсутствует отрицательный заряд у одного остатка и резко ослабляется стабилизирующая энергия его электростатического взаимодействия с остатком Arg². Это и служит причиной меньшей предпочтительности конформации A₁ по сравнению с конформацией A₂, которая и становится наиболее выгодной.

К интересному результату, хорошо коррелирующемуся с биологической активностью [386], привел расчет АТ III, отличающегося от АТ II отсутствием в последовательности первого остатка. Удаление Asp¹ существенно изменяет положение конформационного равновесия A ⇌ B, сдвигая его вправо. Наиболее выгодной становится конформация B₄ (или B₅, что одно и то же), а лучшая у АТ II конформация A₁ приобретает высокую относительную энергию (7,4 ккал/моль) (см. табл. IV.26) и становится мало-реальной. Одна из причин повышения энергии по сравнению с B₄ связана с большей величиной у этой конформации дестабилизирующей электростатической энергии взаимодействий положительных зарядов, принадлежащих основной и боковой цепям остатка Arg². У конформации A₁ энергия ван-дер-ваальных взаимодействий остатка Arg составляет –14,0 ккал/моль, а у B₄ – –9,0 ккал/моль. Вторая причина смещения конформационного равновесия при отсутствии в последовательности ангиотензина N-концевого остатка Asp¹ заключается в более компактной упаковке и, следовательно, в меньшей энергии дисперсионных межостаточных взаимодействий валентно-несвязанных атомов боковой цепи Arg² в конформации B₄ (–22,1 ккал/моль), чем в A₁ (–17,6 ккал/моль).

АТ I – декапептид, содержащий в С-концевой части последовательности остатки His и Leu. Удлинение цепи заметно повлияло на распределение конформаций по энергии. Оно привело к большей детерминации конформационных состояний пептида, т.е. к ограничению конформационной свободы. Из структурного набора АТ II фактически разрешенными остаются три конформации группы А (A₁, A₂ и A₄), причем самыми низкоэнергетическими по-прежнему являются A₁ и A₂. Конформация A₂ более выгодна по энергии, чем A₁, так как ее потенциальная поверхность более комплементарна поверхности дополнительного дипептидного фрагмента His⁹-Leu¹⁰. Заметное повышение у АТ I энергии конформаций группы В, делающее их практически запрещенными, объясняется, во-первых, значительно более слабыми взаимодействиями участка His⁹-Leu¹⁰ с остальной частью молекулы (их энергия, например, у В₁ составляет –6,2 ккал/моль, в то время как у A₂ и A₁ соответственно –11,3 и –9,4 ккал/моль), а во-вторых, потерей по стерическим причинам ряда стабилизирующих взаимодействий остатка Phe⁸, концевого у АТ II и промежуточного у АТ I

Энергетические матрицы внутри- и межстаточных невалентных взаимодействий атомов (ккал/моль)
в конформациях $A_1(a)$ и $B_4(b)$ АТ II (верхние строки) и $[Pro^3]$ -АТ II (нижние строки)

a

[illegible]

6

[illegible]

Если удлинение пептидной цепи на два остатка (АТ I) понижает относительную энергию конформаций группы А, то укорочение на два остатка по сравнению с АТ II (АТ II—(1–6)-пептид) действует в противоположную сторону: две из четырех конформаций группы В имеют самую низкую энергию, не превышающую 1,0 ккал/моль. Изменения, однако, не так резки, как в случае АТ I, и конформационные возможности гексапептидного аналога ангиотензина, лишенного с потерей двух остатков ряда стабилизирующих взаимодействий, естественно, возрастают. Реальными при определенных внешних условиях становятся не только конформации группы А, но даже C_1 – F_1 , особенно D_1 . Замены в молекуле АТ II остатков Val в третьем и пятом положениях на остатки Pro ($[Pro^3]$ –АТ II и $[Pro^5]$ –АТ II) и Ala ($[Ala^3]$ –АТ II и $[Ala^5]$ –АТ II) преследовали цель внести определенные, заранее известные стерические затруднения и запретить реализацию большого числа конформаций (первые два пептида) и, напротив, сделать аминокислотную последовательность АТ II более лабильной, а также оценить ограничительный эффект на формирование пространственного строения молекулы достаточно объемных и разветвленных при атоме C^β остатков Val (вторая пара пептидов).

Предшествующий Pro остаток, находясь в R-форме, имеет высокую энергию из-за перекрывания ван-дер-ваальсовых радиусов атомов Н собственной метиленовой группы пролинового цикла. Для этого остатка наиболее предпочтительна форма В, а затем L. Поэтому дипептидный участок Arg^2 – Pro^3 у аналога $[Pro^3]$ –АТ II может обладать только развернутым шейпом *e*. Следовательно, реализация шести из 14 низкоэнергетических конформаций АТ II с R-формой Arg^2 и f-шейпом дипептида Arg^2 – Pro^3 становится у синтетического аналога маловероятной. Предпочтительными остаются лишь структуры A_1 и A_4 с относительной энергией 0 и 4,5 ккал/моль. Энергия остальных превышает 10,0 ккал/моль.

В табл. IV.27 сопоставлены энергетические матрицы взаимодействий валентно-несвязанных атомов в конформациях A_1 природного гормона и $[Pro^3]$ –АТ II. Видно, что замена Val^3 на Pro^3 практически не сказывается на энергии невалентных контактов. Без изменений остается геометрия конформаций A_1 в обеих молекулах. Заметно увеличился существовавший и ранее разрыв в энергии структур А и В. Теперь он значительно превысил отметку 10,0 ккал/моль. В табл. IV.27 сравнены внутриостаточные энергии взаимодействия конформации B_4 АТ II (4,6 ккал/моль) с лучшей конформацией группы В – также B_4 $[Pro^3]$ –АТ II (11,8 ккал/моль). Рост конформационной энергии у синтетического аналога обусловлен ослаблением стабилизации приблизительно на 9,0 ккал/моль между Arg^2 и Val^5 , His⁶. Причиной послужило жесткое пролиновое кольцо, ставшее помехой для сближения боковых цепей этих остатков. При замене Val^5 на Pro^5 не запрещаются конформации ни в группе А, ни в группе В, так как в обоих случаях участок Tyr^4 – Val^5 имеет развернутую форму. Тем не менее расчет показал, что ситуация здесь в принципе аналогична только что рассмотренной, т.е. наблюдается понижение относительной энергии конформаций А и повышение относительной энергии конформаций В.

Приведенные в табл. IV.28 данные о лучших структурах групп A_1 и A_2 природного пептида и его $[Pro^5]$ -аналога объясняют энергетическую дифференциацию менее эффективными невалентными взаимодействиями остатка Pro в B_1 по сравнению с остатком Val. Конформации A_1 обеих молекул энергетически и геометрически практически идентичны.

Как показал расчет, замены Val^3 на Ala^3 и Val^5 на Ala^5 , представляющие, казалось бы, большую конформационную свободу основной цепи гормона в пределах тех же минимумов многомерной потенциальной поверхности, практически не повлияли на конформационное равновесие. По-прежнему структуры группы A в полярной среде предпочтительнее B, структуры C_1-F_1 столь же высокоэнергетичны. Поэтому можно ожидать, что спектр биологической активности аналогов в отличие от пролиновых будет достаточно полно воспроизводить спектр активности природного АТ II. В $[Pro^2]$ -АТ II замена касается остатка, не только dictующего чисто стерические условия формирования конформационных состояний молекулы, как у рассматриваемых выше четырех синтетических аналогов природного гормона, но и, безусловно, играющего важную роль в специфическом узнавании или в соответствующих последствиях гормон-рецепторных взаимодействий. Такая двойственность осложняет трактовку результатов теоретического конформационного анализа этого аналога, представленных в табл. IV.26. Любопытно, что у $[Pro^2]$ -АТ II самые предпочтительные конформации — B_6 и F_1 , имеющие очень высокую энергию у АТ II. В следующих пяти аналогах остаток $[Phe^8]$ -АТ II последовательно заменен на остатки Ala, Leu, Val, Ile и, наконец, Tyr, т.е. на гидрофобные остатки постепенно увеличивающегося объема. Существенных изменений конформационных возможностей по сравнению с природным октапептидом при этом не наблюдается. Во всех случаях доминируют конформации группы A. Энергетическое распределение конформаций $[Tyr^8]$ -АТ II практически совпадает, как и можно было ожидать, с распределением АТ II.

Выбор для расчета всех аналогов АТ II, представленных в табл. IV.26, особенно последних шести, обусловлен наличием соответствующего экспериментального материала, который будет проанализирован в следующем томе в свете изложенных результатов конформационного анализа.

Рассмотрение конформационных возможностей молекул БПП₅ и пептида δ -сна вместе с их синтетическими аналогами показывает, что обратная структурная задача, т.е. контролируемая с помощью точечных изменений аминокислотной последовательности детерминация отдельных низкоэнергетических конформаций, ответственных за реализацию спектра физиологического действия природного олигопептида, поддается эффективному решению. Выполнение этой задачи на уровне формы и шейпа пептидного скелета может быть проведено в общем виде, без специального расчета, с помощью целого ряда аминокислотных замен, влияние которых на формирование структуры известно заранее. К простейшим химическим модификациям природной последовательности, не затрагивающим функционально важные аминокислотные остатки,

6

[illegible]

относятся замены Gly на остатки с чисто углеводородными боковыми цепями, например Ala, замены последних на Pro, N-метиллирование, замены остатков с *L*-конфигурацией на *D*-, замены аминокислот на гидроксикислоты. Перечисленные модификации изменяют заранее известным образом характер ближних взаимодействий и, следовательно, исходный набор разрешенных конформационных состояний соответствующего остатка. В некоторых случаях они влияют на взаимодействия смежных остатков, причем в ряде случаев это также заведомо известно. Решение обратной структурной задачи завершается расчетом вариантов, отобранных по форме и шейпу из набора предпочтительных для природного пептида конформаций. При иных заменах, затрагивающих предполагаемые функциональные остатки, привлечение теоретического анализа на всех этапах решения обратной задачи неизбежно.

При обсуждении обратной структурной задачи предполагались известными химическое строение природных олигопептидов и их функции. Это было необходимо для выяснения структурно-функциональной организации таких соединений и поиска для них строгой формулировки проблемы структуры и функции. Однако заранее иметь всю информацию, тем более количественную, о биологической активности пептида совсем не обязательно. Более того, рассмотренный подход целесообразно использовать именно в самом начале исследования, до проведения экспериментальной части. При справедливости предположенных для олигопептидов структурно-функциональных соотношений, которые на современном уровне развития этой области нельзя еще считать строго доказанными (отчасти они имеют эвристический характер), по следующей схеме можно проводить:

- 1) теоретический конформационный анализ природного олигопептида и определение всех наиболее предпочтительных по энергии и, следовательно, потенциально биологически активных конформационных состояний (решение прямой структурной задачи);

- 2) конструирование серии искусственных аналогов, пространственные структуры которых в своей совокупности отвечают набору низкоэнергетических, биологически активных конформаций (решение обратной структурной задачи);

- 3) синтез и биохимическое исследование полученных из решения обратной структурной задачи модельных аналогов, определение спектра биологического действия природного пептида, количественная оценка функциональной активности, изучение специфических взаимодействий с рецепторами и т.д;

- 4) анализ результатов расчета и эксперимента и определение на атомно-молекулярном уровне зависимости между химическим строением, конформационными возможностями и эффективностью реализации биологической активности природного олигопептида.

Суть данной схемы заключается в том, что экспериментальному изучению структуры, биологической активности и механизма функционирования предшествует теоретическое моделирование с привлечением методов конформационного анализа и квантовой химии. В этом отношении предложенная схема, по существу, соответствует инженерному подходу.

- 1 Завальный А А Попов Е М //Молекуляр биология 1982 Т 16 С 129–141
- 2 Low B W Preston H S Sato A et al // Proc Nat Acad Sci US 1976 Vol 73 P 2991–2994
- 3 Tsernoglou D Petsko G A // FEBS Lett 1976 Vol 68 P 1–4
- 4 Tsernoglou D Petsko G A // Proc Nat Acad Sci US 1977 Vol 74 P 971–974
- 5 Tsernoglou D Petsko G A McGueen J E Hermans J // Science 1977 Vol 197 P 1378–1381
- 6 Kimball M R Sato A Richardson J S et al // Biochem and Biophys Res Commun 1979 Vol 88 P 950–959
- 7 Creighton T E // Progr Biophys and Mol Biol 1978 Vol 33 P 231–297
- 8 Kassel B Laskowski M // Biochem and Biophys Res Commun 1965 Vol 20 P 463–468
- 9 Huber R Kukla D Bode W et al // J Mol Biol 1974 Vol 89 P 73–101
- 10 Deisenhofer J Steigemann W et al // Acta crystallogr B 1975 Vol 31 P 238–250
- 11 Попов Е М Годжаев Н М Измайлова Л И и др // Биоорганическая химия 1982 Т 8 С 776–816
- 12 Nemethy G Scheraga H A // Quart Rev Biophys 1977 Vol 10 P 239–352
- 13 Diamond R // Acta crystallogr A 1971 Vol 27 P 436–452
- 14 Pauling L The nature of the chemical bond 3rd ed N Y Cornell Univ press, 1960,
- 15 Попов Е М Дашевский В Г Липкин Г М Архипова С Ф // Молекуляр биология 1988 Т 22 С 612–630
- 16 Go N // Annu Rev Biophys and Bioeng 1983 Vol 12 P 183–210
- 17 Брандтс Д Ф // Структура и стабильность биологических макромолекул М Мир 1973 С 174–254
- 18 Baldwin R L // TIBS 1989 Vol 14 P 291–294
- 19 Creighton T E // Biochem J 1990 Vol 270 P 1–16
- 20 Gething M J Sambrook J // Nature 1992 Vol 365 P 33–45
- 21 Jaenicke R // Philos Trans Roy Soc London B 1993 Vol 339 P 287–295
- 22 Lattman E E Rose G D // Proc Nat Acad Sci US 1993 Vol 90 P 439–441
- 23 Fersht A R // FEBS Lett 1993 Vol 325 P 5–16
- 24 Lecomte J T J Matthews G R // Protein Eng 1993 Vol 6 P 1–10
- 25 Попов Е М Естествознание и проблема белка М Высш шк 1989
- 26 Попов Е М Структурная организация белков М Наука, 1989
- 27 Troyer J M, Cohen F E // Rev Comput. Chem 1991 Vol 2 P 57–86
- 28 Vasquez M Nemethy G Scheraga H A // Chem Rev 1994 Vol 94 P 2183–2239
- 29 Levitt M Warshel A // Nature 1975 Vol 253 P 694–698
- 30 Levitt M // J Mol Biol 1976 Vol 104 P 59–107
- 31 Warshel A Levitt M // Ibid Vol 106 P 421–437
- 32 Kuntz I D Grippen G M Kollman P A Kimelman D // Ibid P 983–994
- 33 Tanaka S Scheraga H A // Proc Nat Acad Sci US 1975 Vol 72 P 3802–3806
- 34 Tanaka S Scheraga H A // Ibid P 1320–1324
- 35 Tanaka S Scheraga H A // Macromolecules 1977 Vol 10 P 554–562
- 36 Tanaka S Scheraga H A // Ibid P 305–312
- 37 Gabel D Rasse D Scheraga H A // Intern J Peptide and Protein Res 1976 Vol 8 P 237–252
- 38 Lewis P N Scheraga H A // Arch Biochem and Biophys 1971 Vol 144 P 576–583
- 39 Burgess A W Ponnuswamy P R Scheraga H A // Isr J Chem 1974 Vol 12 P 239–286
- 40 Ycas M Goel N S Jacobsen J W // J Theor Biol 1978 Vol 72 P 443–451
- 41 Coel N S Ycas M // Ibid 1979 Vol 77 P 253–260
- 42 Havel T F Crippen G M Kuntz I D // Biopolymers 1979 Vol 18 P 73–90
- 43 Wako H Scheraga H A // Macromolecules 1981 Vol 14 P 961–970
- 44 Wako H Scheraga H A // J Protein Chem 1982 Vol 1 P 5–15
- 45 Wako H Scheraga H A // Ibid P 85–99
- 46 Miyazawa S Jernigan R L // Biopolymers 1982 Vol 21 P 1333–1363
- 47 Gunn J R Monge A Frieser R A Marshall C H // J Phys Chem 1994 Vol 98 P 702–710
- 48 Sippl M J // J Mol Biol 1990 Vol 213 P 859–864
- 49 Hendlich M Lackner P Weitkuc S et al // Ibid Vol 216 P 167–180

50. Casari G , Suppl M // Ibid. 1992. Vol. 224. P. 725-736.
51. Suppl M J., Weutckus S // Proteins: Struct. Funct. Genet. 1992. Vol. 13. P. 258-269
52. Levitt M // Curr. Opinion Struct. Biol. 1991. Vol. 1. P. 224-236.
53. Kolinski A , Skolnick J // J. Chem. Phys. 1992. Vol. 97. P. 9412-9418.
54. Sun S // Protein Sci. 1993. Vol. 2 P. 762-771.
55. Kolinski A , Godzik A , Skolnick J // J. Chem. Phys. 1993. Vol. 98. P. 7420-7430
56. Godzik A , Kolinski A , Skolnick J // J. Comput. Aided Mol. Des. 1993. Vol. 7 P. 397-408.
57. Go N , Taketomi H // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1978. Vol. 75. P. 559-563.
58. Go N , Taketomi H // Intern J Peptide and Protein Res. 1979 Vol. 13. P. 235-244.
59. Gō N., Taketomi H // Ibid. P. 447-457
60. Go N , Abe H // Biopolymers. 1981. Vol. 20. P. 991-1011.
61. Gō N. // Intern. J. Peptide and Protein. Res. 1975. Vol. 7. P. 313-323.
62. Brandts J F // J. Amer. Chem. Soc. 1964. Vol. 86. P. 4291-4302.
63. Brandts J F // Ibid. P. 4302-4309.
64. Brandts J.F // Ibid. 1965. Vol. 87. P. 2759-2765.
65. Kanehisa M I , Tsong T Y // J. Mol. Biol. 1978. Vol. 124. P. 177-194.
66. Go N. // Adv. Biophys. 1976. Vol. 9. P. 65-113.
67. Karplus M , Weaver D L // Biopolymers 1979. Vol. 18. P. 1421-1437.
68. Kim P S , Baldwin R L // Annu. Rev. Biochem. 1979. Vol. 48. P. 459-489.
69. Lau K.F , Dill K A // Macromolecules. 1989. Vol. 22. P. 3986-3991.
70. Chan H S , Dill K A // J. Chem. Phys. 1989. Vol. 90. P. 492-498.
71. Dill K A , Shortle D // Annu. Rev. Biochem. 1991. Vol. 60. P. 795-820.
72. Chan H S , Dill K A // Annu. Rev. Biophys. and Biophys Chem. 1991. Vol. 20. P. 447-480.
73. Chan H S , Dill K A // Macromolecules. 1989. Vol. 22. P. 4559-4565.
74. Chan H.S , Dill K.A // J. Chem. Phys. 1991. Vol. 95. P. 3775-3781.
75. Dill K A , Fiebig K M , Chan H S // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1993. Vol. 90. P. 1942-1946.
76. Fiebig K M , Dill K A // J Chem. Phys. 1993. Vol. 98. P. 3475-3481.
77. Lau K F , Dill K A // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1990 Vol. 87. P. 638-644.
78. Shortle D., Chan H S , Dill K A // Protein Sci. 1992. Vol. 1. P. 201-209.
79. Kolinski A , Skolnick J , Yaris R // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1986. Vol. 83. P. 7267-7271.
80. Skolnick J , Kolinski A // Annu. Rev. Phys. Chem. 1989. Vol. 40. P. 207-230.
81. O'Toole E M., Panagiotopoulos A Z // J. Chem. Phys. 1992. Vol. 97. P. 8644-8651.
82. O'Toole E M., Panagiotopoulos A Z // Ibid. 1993. Vol. 98. P. 3185-3190.
83. Unger R , Moul J // J. Mol. Biol. 1993. Vol. 231. P. 75-86.
84. Matheson R R , Scheraga H A // Macromolecules. 1978. Vol. 11. P. 819-830.
85. Shakhnovich E I , Farztdinov G , Gutin A M , Karplus M // Phys. Rev. Lett. 1991. Vol. 67 P. 1665-1670.
86. Leopold P E., Montal M , Onuchic J N // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1992. Vol. 89 P. 8721-8725.
87. Leopold P.E., Shakhnovich E I // XXVI Hawaii Intern. conf. on system sciences. Honolulu: IEEE Computer Soc. press, 1993 P. 726.
88. Sali A , Shakhnovich E , Karplus M // J Mol Biol. 1994. Vol. 235. P. 1614-1625.
89. Shakhnovich E I , Gutin A M. // Nature. 1990. Vol. 346. P. 773-776.
90. Shakhnovich E I , Gutin A M // Biophys. Chem. 1989. Vol. 34. P. 187-195.
91. Shakhnovich E.I , Gutin A M // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1993. Vol. 90. P. 7195-7200.
92. Shakhnovich E.I., Gutin A M // Protein Eng. 1993. Vol. 6. P. 793-801.
93. Shakhnovich E.I. // Phys Rev. Lett. 1994. Vol. 72. P. 3907-3911.
94. Skolnick J , Kolinski A // J. Mol. Biol. 1991. Vol. 221. P. 499-510.
95. Godzik A , Kolinski A , Skolnick J // J. Comput. Chem. 1993. Vol. 14. P. 1194-1201.
96. Hao M -H , Scheraga H A // J Phys. Chem 1994. Vol. 98. P. 4940-4952.
97. Skolnick J , Kolinski A // Science. 1990. Vol. 250. P. 1121-1130.
98. Handel T M., Williams S A , De Grado W F // Ibid. 1993. Vol. 261. P. 879-886.
99. Covell D G , Jernigan R L. // Biochemistry. 1990. Vol. 29. P. 3287-3292.
100. Miyazawa S , Jernigan R L // Macromolecules. 1985 Vol. 18. P. 534-541.
101. Covell D G // Proteins. Struct Funct Genet. 1992. Vol. 14. P. 409-415.
102. Hinds D A , Levitt M // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1992. Vol. 89. P. 2536-2540.
103. Sullinger F H , Head-Gordon T , Hirshfeld C L // Phys Rev 1993. Vol. 48. P. 1469-1501.
104. Head-Gordon T , Sullinger F H // Ibid P. 1502-1527
105. Dill K A , Bromberg S , Yue K et al. // Protein Sci 1995. Vol. 4. P. 561-602.

106. Orr W.J.C. // Trans. Faraday Soc. 1947. Vol. 43. P. 12–27.
107. Попов Е.М., Демин В.В., Шибанова Е.В. Проблема белка. Т. 2. Пространственное строение. М.: Наука, 1996.
108. Попов Е.М. Структурно-функциональная организация белков. М.: Наука, 1992.
109. Попов Е.М. // Природа. 1993. № 6. С. 59–67.
110. Lewis P.N., Scheraga H.A. // Arch. Biochem. and Biophys. 1971. Vol. 144. P. 584–588.
111. Lewis P.N., Momany F.A., Scheraga H.A. // Isr. J. Chem. 1973. Vol. 11. P. 121–180.
112. Птицын О.Б., Рашин А.А. // Докл. АН СССР. 1973. Т. 213. С. 413–416.
113. Ptitsyn O.B., Rashin A.A. // Biophys. Chem. 1975. Vol. 3. P. 1–20.
114. Птицын О.Б. // Вестн. АН СССР. 1973. N 5/6. С. 57–68.
115. Денисюк Ф.И., Птицын О.Б., Финкельштейн А.В. // Биофизика. 1974. Т. 19. С. 549–560.
116. Finkelstein A.V., Ptitsyn O.B. // J. Mol. Biol. 1976. Vol. 103. P. 15–24.
117. Finkelstein A.V., Ptitsyn O.B. // Biopolymers. 1977. Vol. 16. P. 469–496.
118. Finkelstein A.V., Kozitsyn S.A., Ptitsyn O.B. // FEBS Lett. 1975. Vol. 60. P. 137–140.
119. Finkelstein A.V., Ptitsyn O.B. // Biopolymers. 1977. Vol. 16. P. 497–524.
120. Finkelstein A.V. // Ibid. P. 525–529.
121. Лим В.И. // Докл. АН СССР. 1975. Т. 222. С. 1467–1469.
122. Lim V.I., Efimov A.V. // FEBS Lett. 1976. Vol. 69. P. 41–44.
123. Лим В.И., Мазанов А.Л., Ефимов А.В. // Молекуляр. биология. 1978. Т. 12. С. 206–212.
124. Лим В.И. // Там же. С. 213–218.
125. Мазанов А.Л., Лим В.И. // Там же. С. 219–232.
126. Srinivansan R. // Ind. J. Biochem. and Biophys. 1976. Vol. 13. P. 192–193.
127. Kotelchuck D., Scheraga H.A. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1968. Vol. 61. P. 1163–1170.
128. Kotelchuck D., Scheraga H.A. // Ibid. 1969. Vol. 62. P. 14–21.
129. Finkelstein A.V., Ptitsyn O.B. // J. Mol. Biol. 1971. Vol. 62. P. 613–624.
130. Scheraga H.A. // Pure and Appl. Chem. 1973. Vol. 36. P. 1–20.
131. Ponnuswamy P.K., Warne P.K., Scheraga H.A. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1973. Vol. 70. P. 830–833.
132. Burgess A.W., Scheraga H.A. // Ibid. 1975. Vol. 72. P. 1221–1225.
133. Kabat E.A., Wu T.T. // Biopolymers. 1973. Vol. 12. P. 751–774.
134. Kabat E.A., Wu T.T. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1973. Vol. 70. P. 1473–1477.
135. Kabat E.A., Wu T.T. // Ibid. Vol. 71. P. 4217–4220.
136. Robson B., Pain R.H. // Biochem. J. 1974. Vol. 141. P. 853–867.
137. Robson B., Pain R.H. // Ibid. P. 869–882.
138. Chou P.Y., Fasman G.D. // Biochemistry. 1974. Vol. 13. P. 211–221.
139. Chou P.Y., Fasman G.D. // Ibid. P. 222–245.
140. Ptitsyn O.B. // FEBS Lett. 1981. Vol. 131. P. 197–202.
141. Птицын О.Б. // Молекуляр. биология. Т. 18. 1984. С. 574–590.
142. Kuntz I.D. // J. Amer. Chem. Soc. 1972. Vol. 94. P. 4009–4012.
143. Kuntz I.D. // Ibid. P. 8568–8572.
144. Kabsch W., Sander C. // FEBS Lett. 1983. Vol. 155. P. 179–182.
145. Ptitsyn O.B., Volkenshtein M.V. // J. Biomol. Struct. and Dyn. 1986. Vol. 4. P. 137–156.
146. Doolittle R.F. // Prediction of protein structure and principles of protein conformation / Ed. G.D. Fasman. N.Y.: Plenum press, 1989. P. 599–623.
147. Levitt M., Chothia C. // Nature. 1976. Vol. 261. P. 552–558.
148. Fasman G.D. // Poly- α -amino acids / Ed. G.D. Fasman. N.Y.: Dekker, 1967. P. 499–604.
149. Fasman G.D. // Prediction of protein structure and the principles of protein conformation / Ed. G.D. Fasman. N.Y.: Plenum press, 1989. P. 193–316.
150. Chothia C. // Annu. Rev. Biochem. 1984. Vol. 53. P. 537–572.
151. Chothia C., Janin J. // Biochemistry. 1982. Vol. 21. P. 3955–3965.
152. Chothia C., Lesk A.M. // J. Mol. Biol. 1982. Vol. 160. P. 303–342.
153. Levitt M., Greer J. // Ibid. 1977. Vol. 114. P. 181–239.
154. Levitt M. // Ibid. Vol. 117. P. 723–764.
155. Levitt M. // Biochemistry. 1978. Vol. 17. P. 4277–4285.
156. Cohen F.E., Sternberg M.J.E., Taylor W.R. // Nature. 1980. Vol. 285. P. 378–382.
157. Cohen F.E., Sternberg M.J.E., Taylor W.R. // J. Mol. Biol. 1981. Vol. 148. P. 253–272.
158. Cohen F.E., Sternberg M.J.E., Taylor W.R. // Ibid. 1982. Vol. 156. P. 821–862.
159. Cohen C., Parry D.A.D. // Trends Biochem. Sci. 1986. Vol. 11. P. 245–248.

160. Fasman G.D. // *Biochemistry*. 1987. Vol. 26. P. 559-579.
161. Sternberg M.J.E., Thornton J.M. // *J. Mol. Biol.* 1977. Vol. 110. P. 269-283.
162. Sternberg M.J.E., Thornton J.M. // *Ibid.* P. 285-296.
163. Sternberg M.J.E., Thornton J.M. // *Ibid.* 1976. Vol. 105. P. 367-382.
164. Sternberg M.J.E., Thornton J.M. // *Ibid.* 1977. Vol. 113. P. 401-413.
165. Sternberg M.J.E., Thornton J.M. // *Ibid.* Vol. 115. P. 1-17.
166. Sternberg M.J.E., Thornton J.M. // *Nature*. 1978. Vol. 271. P. 15-20.
167. Richmond R.J., Richards F.M. // *J. Mol. Biol.* 1978. Vol. 119. P. 537-555.
168. Cohen F.E., Sternberg M.J.E. // *Ibid.* 1980. Vol. 137. P. 9-22.
169. Cohen F.E., Richmond J.T., Richards F.M.J. // *Ibid.* 1979. Vol. 132. P. 275-288.
170. Robson B., Osguthorpe D.J. // *Ibid.* P. 19-51.
171. Sternberg M.J.E., Cohen F.E., Taylor W.R., Feldman R.J. // *Philos. Trans. Roy. Soc. London*. B. 1981. Vol. 293. P. 177-189.
172. Chou P.Y., Fasman G.D. // *J. Mol. Biol.* 1977. Vol. 115. P. 135-175.
173. Rose G.D., Seltzer J.P. // *Ibid.* Vol. 113. P. 153-164.
174. Lifson S., Sander C. // *Ibid.* 1980. Vol. 139. P. 627-641.
175. Robson B., Hillier I.H., Guest M.F. // *Chem. Soc. Faraday Trans. Part II*. 1978. Vol. 71. P. 1311-1317.
176. Лим В.И. // *Докл. АН СССР*. 1972. Т. 203. С. 480-484.
177. Лим В.И. // *Биофизика*. 1974. Т. 19. С. 562-575.
178. Busetta B., Hospital M. // *Biochim. et Biophys. acta*. 1982. Vol. 701. P. 111-118.
179. Lenstra J.A. // *Ibid.* 1977. Vol. 491. P. 333-338.
180. Nagano K. // *J. Mol. Biol.* 1977. Vol. 109. P. 235-250.
181. Nagano K. // *Ibid.* P. 251-274.
182. Tanaka S., Scheraga H.A. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1975. Vol. 72. P. 3802-3806.
183. Argos P., Schwarz J. Schweiz J. // *Biochim. et biophys. acta*. 1976. Vol. 439. P. 261-273.
184. Шульц Г., Ширмер Р. Принципы структурной организации белка. М.: Мир, 1982.
185. Nishikawa K. // *Biochim. et biophys. acta*. 1983. Vol. 748. P. 285-299.
186. Richardson J., Richardson D. // *Science*. 1988. Vol. 240. P. 1648-1652.
187. Richardson J., Richardson D. // *Prediction of protein structure and the principles of protein conformation* / Ed. G.D. Fasman. N.Y.: Plenum press, 1989. P. 1-98.
188. Nakashima H., Nishikawa K., Oai T. // *J. Biochem. (Tokyo)*. 1986. Vol. 99. P. 153-162.
189. Kabsh W., Sander C. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1984. Vol. 81. P. 1075-1078.
190. Kabsh W., Sander C. // *Nature*. 1985. Vol. 317. P. 207.
191. Varghese J.N., Laver W.G., Colman P.M. // *Ibid.* 1983. Vol. 303. P. 35-40.
192. Bloomer A.C., Champness J.N., Bricogne G. et al. // *Ibid.* 1978. Vol. 276. P. 362-368.
193. Kolb E., Hudson P.J., Harris J.I. // *Europ. J. Biochem.* 1980. Vol. 108. P. 587-597.
194. Titani K., Hermodson M.A., Ericsson C.H. et al. // *Nature*. 1982. Vol. 238. P. 35-37.
195. Holmes M.A., Matthews B.W. // *J. Mol. Biol.* 1982. Vol. 160. P. 623-639.
196. Wilson I.A., Haft D.H., Getzoff E.D. et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1985. Vol. 32. P. 5255-5259.
197. Harrison S.C. // *Nature*. 1985. Vol. 313. P. 736-737.
198. Leszczynski J.F., Rose G.D. // *Science*. 1986. Vol. 234. P. 849-855.
199. Ring C.S., Kneller D.G., Langridge R., Cohen F.E. // *J. Mol. Biol.* 1992. Vol. 224. P. 685-699.
200. Leszczynski J.F., Rose G.D. // *Science*. 1986. Vol. 234. P. 47-53.
201. Milner-White E.J., Piet R. // *TIBS*. 1987. Vol. 12. P. 189-191.
202. Wallace C.J.A. // *J. Biol. Chem.* 1987. Vol. 262. P. 16767-16770.
203. Robson B., Pain R.H. // *J. Mol. Biol.* 1971. Vol. 58. P. 237-259.
204. Robson B. // *Biochem. J.* 1974. Vol. 141. P. 853-867.
205. Robson B. // *TIBS*. 1976. Vol. 3. P. 49-50.
206. Robson B., Suzuki E. // *Mol. Biol.* 1976. Vol. 107. P. 327-356.
207. Garnier J., Osguthorpe D.J., Robson B. // *Ibid.* 1978. Vol. 120. P. 97-120.
208. Gibrat J.F. Modelization by computers of the 3-D structure of proteins. Ph. D. Thesis. P., 1986.
209. Garnier J., Robson B. // *Prediction of protein structure and the principles of protein conformation* / Ed. G.D. Fasman. N.Y.: Plenum press, 1989. P. 417-465.
210. Maxfield F.R., Sheraga H.A. // *Biochemistry*. 1976. Vol. 15. P. 5138-5153.
211. Pitsyn O.B., Finkelstein A.V. // *Biopolymers*. 1983. Vol. 22. P. 15-25.
212. Gibrat J.-E., Garnier J., Robson B. // *J. Mol. Biol.* 1987. Vol. 198. P. 425-443.

213. Qian N., Sejnowski T.J. // *Ibid.* 1988. Vol. 202. P. 865–884.
214. Blou V., Gibrat J.F., Levin J.M., Robson B. // *Protein Eng.* 1988. Vol. 2. P. 185–191.
215. Levin J.M., Garnier J. // *Biochim et biophys. acta.* 1988. Vol. 955. P. 283–295.
216. Kneller D.G., Cohen F.E., Langridge R. // *J. Mol. Biol.* 1990. Vol. 214. P. 171–182.
217. Salzberg S., Cost S. // *Ibid.* 1992. Vol. 227. P. 371–374.
218. Zhang X., Mesirov J.P., Waltz D.L. // *Ibid.* Vol. 225. P. 1049–1069.
219. Macllin R., Shavlik J.W. // *Machine Learning.* 1993. Vol. 11. P. 195–215.
220. Rost B., Sander C., Schneider R. // *TIBS.* 1993. Vol. 18. P. 120–123.
221. Matthews B.W. // *Biochim. et Biophys. acta.* 1975. Vol. 405. P. 442–451.
222. Rost B., Sander C. // *J. Mol. Biol.* 1993. Vol. 232. P. 584–599.
223. Rost B., Sander C., Schneider R. // *Ibid.* 1994. Vol. 235. P. 13–26.
224. Chothia C., Lesk A.M. // *EMBO J.* 1986. Vol. 5. P. 823–826.
225. Taylor W.R., Orengo C.A. // *J. Mol. Biol.* 1989. Vol. 208. P. 505–519.
226. Overington J., Johnson M.S., Sali A., Blundell T.L. // *Proc. Roy. Soc. London.* 1990. Vol. 241. P. 132–145.
227. Summers N.L., Karplus M. // *J. Mol. Biol.* 1990. Vol. 216. P. 991–1016.
228. Schneider R., Sander C. // *Proteins.* 1991. Vol. 9. P. 56–68.
229. Holm L., Sander C. // *Ibid.* 1992. Vol. 14. P. 213–223.
230. Levitt M. // *J. Mol. Biol.* 1992. Vol. 226. P. 507–533.
231. Taylor W.R. // *Nature.* 1992. Vol. 356. P. 478–480.
232. Bairoch A., Boeckmann B. // *Nucl. Acids Res.* 1992. Vol. P. 2019–2022.
233. Понов Е.М. // *Молекуляр. биология.* 1980. Т. 14. С. 35–63.
234. Warne P.K., Momany F.A., Rumball S.V. et al. // *Biochemistry.* 1974. Vol. 13. P. 768–776.
235. Svenson M.K., Burgess A.W., Scheraga H.A. // *Frontiers in physicochemical biology* / Ed. B. Pullman. N.Y.: Acad. press, 1978. P. 115–140.
236. Palmer K.A., Scheraga H.A., Riordan J.F., Vallee B.L. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1986. Vol. 83. P. 1965–1971.
237. Greer J. // *J. Mol. Biol.* 1981. Vol. 153. P. 1027–1056.
238. Greer J. // *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 1990. Vol. 7. P. 317–325.
239. Greer J. // *Science.* 1985. Vol. 228. P. 1055–1063.
240. Hutches C., Greer J. // *Crit. Rev. Biochem. and Mol. Biol.* 1991. Vol. 26. P. 77–111.
241. Blundell T.L., Sibanda B.L., Sternberg M.J.E., Thornton J.M. // *Nature.* 1987. Vol. 326. P. 347–351.
242. Sutcliffe M.J., Haneef I., Garney D., Blundell T.L. // *Protein Eng.* 1987. Vol. 1. P. 377–384.
243. Sutcliffe M.J., Hayes F.R.F., Blundell T.L. // *Ibid.* P. 385–391.
244. Blundell T.L., Carney D., Gardner S. et al. // *Europ. J. Biochem.* 1988. Vol. 172. P. 513–520.
245. Ring C.S., Cohen F.E. // *FASEB J.* 1993. Vol. 7. P. 783–793.
246. Rackovsky S. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1993. Vol. 90. P. 644–649.
247. Ring C.S., Sun E., McKerrow J.H. et al. // *Ibid.* P. 3583–3587.
248. Sudarsanam S., Virca G.D., March C.J., Srinivasan S. // *J. Comput. Aided Mol. Des.* 1992. Vol. 6. P. 223–231.
249. Wang J., Yan Y., Garrett T.P. et al. // *Nature.* 1990. Vol. 348. P. 411–415.
250. Ryu S.-E., Kwong P.D., Trunch A. et al. // *Ibid.* P. 419–422.
251. Williams A.F., Barclay A.N. // *Annu. Rev. Immunol.* 1988. Vol. 6. P. 381–400.
252. Williams A.F., Davis S.J., He Q., Barclay A.N. // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1989. Vol. 54. P. 637–645.
253. Arthos J., Deen K.C., Chaikin M.A. et al. // *Cell.* 1989. Vol. 57. P. 469–480.
254. Bates P.A., McGregor M.J., Islam S.A. et al. // *Protein Eng.* 1989. Vol. 3. P. 13–20.
255. Ashkenazi A., Presta L.G., Marsters S.A. et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1990. Vol. 87. P. 7150–7154.
256. Bowman M.R., MacFerrin K.D., Schreiber S.L., Burakoff S.J. // *Ibid.* P. 9052–9056.
257. Jones T.A., Thirup S. // *EMBO J.* 1986. Vol. 5. P. 819–826.
258. Classens M., Cutsem E.M., Lasters I., Wodak S. // *Protein Eng.* 1989. Vol. 2. P. 335–344.
259. Wendoloski J.J., Salemme F.R. // *J. Mol. Graph.* 1992. Vol. 10. P. 124–131.
260. Topham C.M., McLeod A., Eisenmenger F. et al. // *J. Mol. Biol.* 1993. Vol. 229. P. 194–206.
261. Chothia C., Lesk A.M. // *Ibid.* 1987. Vol. 196. P. 901–923.
262. Padlan E.A., Davies D.R. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1975. Vol. 72. P. 819–824.
263. Chothia C., Lesk A.M., Tramontano A. et al. // *Nature.* 1989. Vol. 342. P. 877–881.
264. Levy R., Assulin O., Scherf T. et al. // *Biochemistry.* 1989. Vol. 28. P. 7168–7173.

265. Ziber B., Scherf T., Levitt M., Anglister J. // *Ibid.* 1990. Vol. 29. P. 10032–10037.
266. Queen C., Schneider W.P., Selick H.E. et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1989. Vol. 86. P. 10029–10033.
267. Glaser S.M., Vasquez M., Payne P.W., Schneider W.P. // *J. Immunol.* 1992. Vol. 149. P. 2607–2616.
268. Co M.S., Scheinberg D.A., Aydalovic N.M. et al. // *Mol. Immunol.* 1993. Vol. 30. P. 1361–1370.
269. Kettleborough C.A., Saldanha J., Heath V.J. et al. // *Protein Eng.* 1991. Vol. 4. P. 773–780.
270. Cartler P., Presta L., Gorman C.M. et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1992. Vol. 89. P. 4285–4290.
271. Presta L.G., Lahr S.J., Shields R.L. et al. // *J. Immunol.* 1993. Vol. 151. P. 2623–2628.
272. Kolbinger F., Saldanha J., Hardman N., Bendig M.M. // *Protein Eng.* 1993. Vol. 6. P. 971.
273. Winter G., Wistein C. // *Nature.* 1991. Vol. 349. P. 293–297.
274. Winter G., Harris W. // *J. Immunol. Today.* 1993. Vol. 14. P. 243–255.
275. Panlan E.A. // *Mol. Immunol.* 1994. Vol. 31. P. 169–180.
276. Dudek M.J., Scheraga H.A. // *J. Comput. Chem.* 1990. Vol. 11. P. 121–130.
277. Palmer K.A., Scheraga H.A. // *Ibid.* 1991. Vol. 12. P. 505–512.
278. Palmer K.A., Scheraga H.A. // *Ibid.* 1992. Vol. 13. P. 329–337.
279. Moul J., James M.N.G. // *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 1986. Vol. 1. P. 146–154.
280. Fine R.M., Weng H., Shenkin P.S. et al. // *Ibid.* P. 342–350.
281. Shenkin P.S., Yarmush D.L., Fine R.M. et al. // *Biopolymers.* 1987. Vol. 26. P. 2053–2058.
282. Mas M.T., Smith K.C., Yarmush D.L. et al. // *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 1992. Vol. 14. P. 483–491.
283. Higo J., Collura V., Garnier J. // *Biopolymers.* 1992. Vol. 32. P. 33–50.
284. Gibrat J.-F., Collura V., Higo J., Garnier J. // *Immunomethods / Ed. E.A. Padlan. N.Y.: Acad. press,* 1992. P. 107.
285. Collura V., Higo J., Garnier J. // *Protein Sci.* 1993. Vol. 2. P. 1502–1510.
286. Zheng Q., Rosenfeld R., Vajda S., DeLisi C. // *J. Comput. Chem.* 1993. Vol. 14. P. 556–563.
287. Elber R. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1993. Vol. 3. P. 260–275.
288. Roitberg A., Elber R. // *J. Chem. Phys.* 1991. Vol. 95. P. 9277–9284.
289. Elber R., Karplus M. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1990. Vol. 112. P. 9161–9167.
290. Zheng Q., Rosenfeld R., DeLisi C., Kyle D.J. // *Protein Sci.* 1994. Vol. 3. P. 493–501.
291. Summers N.L., Karplus M. // *Meth. Enzymol.* 1991. Vol. 202. P. 156–163.
292. Kraulis P.J., Jones T.A. // *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 1987. Vol. 2. P. 188–196.
293. Borchert T.V., Abagyan R., Jaenicke R., Wierenga R.K. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1994. Vol. 91. P. 1515–1519.
294. Borchert T.V., Abagyan R., Radha-Kishan K.V. et al. // *Structure.* 1993. Vol. 1. P. 205–214.
295. Rosenfeld R., Zheng Q., Vajda S., DeLisi C. // *J. Mol. Biol.* 1993. Vol. 23. P. 515–527.
296. Diamond R. // *Acta crystallogr.* 1966. Vol. 21. P. 253–258.
297. Fitzwater S., Scheraga H.A. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1982. Vol. 79. P. 2133–2138.
298. Holm L., Sander C. // *J. Mol. Biol.* 1991. Vol. 218. P. 183–202.
299. Purisima E.O., Scheraga H.A. // *Biopolymers.* 1984. Vol. 23. P. 1207–1230.
300. Nishikawa K., Momany F.A., Scheraga H.A. // *Macromolecules.* 1974. Vol. 7. P. 797–810.
301. Luo N., Shibata M., Rein R. // *J. Math. Chem.* 1991. Vol. 8. P. 217–225.
302. Luo N., Jiang X., Lai L. et al. // *Protein Eng.* 1992. Vol. 5. P. 147–156.
303. Payne P.W. // *Protein Sci.* 1993. Vol. 2. P. 315–322.
304. Rey A., Skolnick J. // *J. Comput. Chem.* 1992. Vol. 13. P. 443–552.
305. Correa P. // *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 1990. Vol. 7. P. 366–374.
306. Nilges M., Brunger A.T. // *Protein Eng.* 1991. Vol. 4. P. 649–655.
307. Nilges M., Brunger A.T. // *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 1993. Vol. 15. P. 133–141.
308. Попов Е.М., Липкинд Г.М. // *Молекуляр. биология.* 1971. Т. 5. С. 624–636.
309. Липкинд Г.М., Попов Е.М. // *Там же.* С. 667–679.
310. Janin J., Wodak S., Levitt M., Maigret B. // *J. Mol. Biol.* 1978. Vol. 125. P. 357–370.
311. Benedetti E., Marelli G., Nemethy G., Scheraga H.A. // *Intern. J. Peptide and Protein Res.* 1983. Vol. 22. P. 1–15.
312. Ponder J.W., Richards F.M. // *J. Mol. Biol.* 1987. Vol. 193. P. 775–784.
313. Morris A.L., MacArthur M.W., Hutchinson E.G., Thornton J.M. // *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 1992. Vol. 12. P. 345–353.
314. Brucoleri R.E., Karplus M. // *Biopolymers.* 1987. Vol. 26. P. 137–151.

315. Dunbrack R.L., Karplus M. // J. Mol. Biol. 1993. Vol. 230. P. 543–556.
316. Schrauber H., Eisenhaber F., Argos P. // Ibid. P. 592–604.
317. McGregor M.J., Islam S.A., Sternberg M.J.E. // Ibid. 1987. Vol. 198. P. 296–303.
318. Rein L.S., Thornton J.M. // Proteins: Struct. Funct. Genet. 1989. Vol. 5. P. 170–179.
319. Summers N.L., Karplus M. // Meth. Enzymol. 1991. Vol. 202. P. 126–137.
320. Summers N.L., Carlson W.D., Karplus M. // J. Mol. Biol. 1987. Vol. 196. P. 175–183.
321. Summers N.L., Karplus M. // Ibid. 1989. Vol. 210. P. 785–794.
322. Gelin B.R., Karplus M. // Biochemistry. 1979. Vol. 18. P. 1256–1260.
323. Lee C., Subbian S. // J. Mol. Biol. 1991. Vol. 217. P. 373–381.
324. Tuffery P., Etchebest C., Hazout S., Lavery R. // J. Comput. Chem. 1993. Vol. 14. P. 790–797.
325. Holm L., Sander C. // Proteins: Struct. Funct. Genet. 1992. Vol. 14. P. 213–220.
326. Wilson C., Gregoret L.M., Agard D.A. // J. Mol. Biol. 1993. Vol. 229. 996–1007.
327. Wilson C., Mace J.E., Agard D.A. // Ibid. 1991. Vol. 220. P. 495–503.
328. Desmet J., Maeyer M.D., Hazes B., Lasters I. // Nature. 1992. Vol. 356. P. 539–542.
329. Lasters I., Desmet J. // Protein Eng. 1993. Vol. 6. P. 717–725.
330. Lee C., Levitt M. // Nature. 1991. Vol. 352. P. 448–451.
331. Lee C. // J. Mol. Biol. 1994. Vol. 236. P. 918–930.
332. Eisenmenger F., Argos P., Abagyan R. // Ibid. 1993. Vol. 231. P. 849–860.
333. David C.W. // J. Comput. Chem. 1993. Vol. 14. P. 715–722.
334. Lim W.A., Hodel A., Somer R.T., Richards F.M. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1994. Vol. 91. P. 423–428.
335. Bowie J.U., Luthy R., Eisenberg D. // Science. 1991. Vol. 253. P. 164–169.
336. Luthy R., Bowie J.U., Eisenberg D. // Nature. 1992. Vol. 356. P. 83–85.
337. Sippl M.J. // Proteins: Struct. Funct. Genet. 1993. Vol. 17. P. 355–362.
338. Havel T.F., Snow M.E. // J. Mol. Biol. 1991. Vol. 217. P. 1–4.
339. Srinivasan S., March C.J., Sudarsanam S. // Protein Sci. 1993. Vol. 2. P. 277–284.
340. Srinivasan S., March C.J., Sudarsanam S. // Biotechnology. 1993. Vol. 11. P. 1579–1586.
341. Sali A., Matsumoto R., McNeil H.P. et al. // J. Biol. Chem. 1993. Vol. 268. P. 9023–9030.
342. Sali A., Blundell T.L. // J. Mol. Biol. 1993. Vol. 234. P. 779–785.
343. Достоевский Ф.М. Собр. соч.: В 10 т. М.: Изд-во худож. лит., 1956. Т. 4.
344. Fruton J.S. Molecules and life. N.Y., Wiley, 1972.
345. Черняк В.С. История логики. М.: Наука, 1986.
346. Бэкон Ф. Новый Органон. М.: Соцэкгиз, 1938.
347. Меклер Л.Б. // Молекуляр. биофизика. 1969. Т. 14. С. 581–584.
348. Меклер Л.Б. // ЖВХО. 1975. Т. 20. С. 334–342.
349. Меклер Л.Б. // Там же. 1980. Т. 25. С. 333–356.
350. Меклер Л.Б. // Биофизика. 1967. Т. 12. С. 569–572.
351. Mekler L.B. Nature. 1967. Vol. 215. P. 481–484.
352. Меклер Л.Б., Идлис Р.Г. // Природа. 1993. № 5. С. 28–70.
353. Пиментел Дж., Мак-Келлан О. Водородная связь. М.: Мир, 1964.
354. Рапли Дж.А. Структура и стабильность биологических макромолекул. М.: Мир, 1973.
355. Идлис Р.Г. // ЖВХО. 1980. Т. 25. С. 431–434.
356. Ramachandran G.N., Ramakrishnan C., Sasisekharan V. // J. Mol. Biol. 1963. Vol. 7. P. 75–102.
357. Чуров С. // Знание – сила. 1987. № 8. С. 68–76.
358. Mitsuhashi H., Yarchoan R., Broder S.H. // Science. 1989. Vol. 249. P. 1533–1542.
359. Tomasselli A.G., Hove W.F., Sawyer T.K. et al. // Chim. Oggi. 1991. № 5. P. 6–27.
360. Kohl N.E., Emini E.A., Schleif W.A. et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1988. Vol. 85. P. 4686–4690.
361. Huff J.R. // J. Med. Chem. 1991. Vol. 34. P. 2305–2310.
362. James M.N.G., Sielecki A.R. // Biochemistry. 1985. Vol. 24. P. 3701–3713.
363. Suguna K., Padlan E.A., Smith C.M. et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1987. Vol. 84. P. 7009–7013.
364. Pearl L. // FEBS Lett. 1987. Vol. 214. P. 8–12.
365. Staples D.S., Hendrikson R.L., Sneider J. et al. // Biochemistry. 1991. Vol. 30. P. 1600–1609.
366. Erickson J.W. // J. Mol. Biol. 1996. Vol. 255. P. 321–346.
367. Попов Е.М. // Молекуляр. биология. 1985. Т. 19. С. 1107–1138.
368. Попов Е.М., Липкинд Г.М., Архипова С.Ф., Дашевский В.Г. // Там же. 1968. Т. 2. С. 622–630.

369. Попов Е.М., Липкинд Г.М., Архипова С.Ф. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1971. № 2. С. 312–319.
370. Попов Е.М., Липкинд Г.М., Плетнев В.З., Архипова С.Ф. // Химия природ. соединений. 1971. № 2. С. 184–191.
371. Плетнев В.З., Громов Э.П., Попов Е.М. // Там же. 1975. № 5. С. 618–626.
372. Попов Е.М., Севастьянова Н.Н. // Биоорган. химия, 1981. Т. 7. С. 1473–1486.
373. Севастьянова Н.Н., Попов Е.М. // Там же. . 518–523.
374. Ondetti M.A., Pluscec J., Waaver E.R. et al. // Chemistry and biology of peptides: Proc. of the III Amer. Peptide Symp. Boston: Ann Arbor Science, 1972, P. 525–532.
375. Chusman H.S., Pluscec J., Williams N.J. et al. // Experientia. 1973. Vol. 29. P. 1032–1036.
376. Ахмедов Н.А., Аббаслы Р.М., Попов Е.М. // Молекуляр. биология. 1989. Т. 23. С. 676–682.
377. Попов Е.М., Ахмедов Н.А., Касумов О.К. и др. // Биоорган. химия. 1980. Т. 6. С. 1620–1631.
378. Гогитидзе Т.В., Попов Е.М. // Там же. 1983. Т. 19. С. 517–535.
379. Sparil S., Haber E. // New Engl. J. Med. 1974. Vol. 291. P. 389–400.
380. Rowe B.P., Grove K.I., Saylor D.L., Speth R.C. // Europ. J. Pharmacol. 1990. Vol. 186. P. 339–345.
381. Chang R.S.L., Lotti V.J. // Mol. Pharmacol. 1990. Vol. 37. P. 347–351.
382. Chang R.S.L., Lotti V.J., Chen T.B., Faust K.A. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1990. Vol. 171. P. 813–819.
383. Никифорович Г.В., Галактионов С.Г., Чипенс Г.И. Конформации пептидных биорегуляторов. М.: Медицина, 1983.
384. Гогитидзе Т.В., Попов Е.М. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. С. 693–793.
385. Попов Е.М. // Успехи химии. 1994. Т. 63. С. 1004–1026.
386. Гогитидзе Т.В., Попов Е.М. // Биоорган. химия, 1993. Т. 19. С. 773–795.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключении суммируем основные выводы и отметим перспективу развития представленных в этой книге исследований молекулярной структурной организации пептидов и белков.

1. Развита подход к решению задачи о структурной организации белка, который включает термодинамическую и физическую теории, а также метод расчета нативной конформации белковой молекулы по известной аминокислотной последовательности.

2. Термодинамическая теория самоорганизации белка разработана на основе нелинейной неравновесной термодинамики, а именно, теории диссипативных систем и теории бифуркаций (см. гл. 1, 2).

3. Согласно предложенной феноменологической бифуркационной теории, самосборка белка осуществляется в неравновесной термодинамической системе, состоящей из двух подсистем – одиночной полипептидной цепи и водного окружения. Возникновение в такой системе процесса свертывания белковой цепи и его самопроизвольное развитие от беспорядка к порядку без нарушения второго начала термодинамики обусловлены неоднородностью случайных изменений флуктуирующей белковой цепи – наличием наряду с множеством обратимых равновесных флуктуаций также необратимых (неравновесных, бифуркационных) флуктуаций, определяемых конкретной аминокислотной последовательностью и текущим конформационным состоянием. Последовательная реализация специфического для данной аминокислотной последовательности набора бифуркационных флуктуаций завершается созданием трехмерной структуры белка. Вызванное спонтанным процессом свертывания уменьшение энтропии одной подсистемы – гетерогенной полипептидной цепи – компенсируется повышением энтропии другой подсистемы – окружающей среды (см. разд. 2.1).

4. Бифуркационная термодинамическая теория и обобщение известных опытных данных о нативных конформациях белковых молекул послужили основой для разработки физической теории структурной организации белка. Физическая теория позволила представить громоздкую задачу структурной организации белка в виде менее сложных задач, поддающихся последовательному рассмотрению. Поэтапный подход к решению осуществлен путем разбиения всех внутримолекулярных невалентных взаимодействий на ближние, средние и дальние. Количественная оценка энергии всех видов взаимодействий производилась с помощью метода атом-атомных потенциалов ван-дер-ваальсовых, электростатических и торсионных взаимодействий и водородных связей (см. разд. 2.2).

5. Ближние взаимодействия изучены путем конформационного анализа метиламидов N-ацетил- α -аминокислот. В результате для всех 20 стан-

дартных аминокислотных остатков стали известны полные наборы низкоэнергетических оптимальных конформаций. Результаты расчета конформационных возможностей и положения конформационного равновесия свободных метиламидов N-ацетил- α -аминокислот в полярных и неполярных средах подтверждены экспериментальными данными, полученными для большого числа этих соединений с помощью методов инфракрасной спектроскопии, ядерного магнитного резонанса, дисперсии оптического вращения и кругового дихроизма, а также дипольных моментов и газожиждкостной осмометрии. Доказано, что используемые в теоретическом анализе потенциальные функции адекватно отражают реальные взаимодействия атомов в пределах одного аминокислотного остатка. Результаты расчетов метиламидов N-ацетил- α -аминокислот были сопоставлены с пространственным строением основных и боковых цепей остатков в белках известной трехмерной структуры. Обнаружена четкая корреляция между конформационными состояниями основных и боковых цепей остатков в белках и геометрией энергетически наиболее выгодных конформаций свободных метиламидов N-ацетил- α -аминокислот. Таким образом, было доказано, что средние и дальние взаимодействия в белках ни в одном случае не вступают в противоречие с требованиями, диктуемыми близкими взаимодействиями. Найденные из анализа метиламидов N-ацетил- α -аминокислот наборы предпочтительных по энергии конформационных состояний являются универсальными и могут служить исходными в расчете трехмерных структур любых природных аминокислотных последовательностей (см. гл. 4, 5).

6. Изучена специфика средних, межостаточных взаимодействий. Показано, что взаимодействия между соседними аминокислотными остатками приводят к заметной энергетической дифференциации пространственных форм даже простейших олигопептидов. Лучшие конформации трипептидов представляют собой комбинации низкоэнергетических структурных вариантов перекрывающихся дипептидов, а лучшие конформации последних являются выборочными сочетаниями только предпочтительных состояний монопептидов (см. гл. 6).

7. Физическая теория и результаты расчета моно-, ди- и трипептидов, подтвержденные сопоставлением с экспериментальным материалом, позволили разработать количественный фрагментарный метод конформационного анализа олигопептидов. Метод основывается на предположении о возможности исследования конформационного состояния сложной аминокислотной последовательности путем предварительного анализа пространственного строения ее простых перекрывающихся фрагментов, конформационные возможности которых рассчитываются с использованием в качестве нулевых приближений всех комбинаций низкоэнергетических оптимальных конформаций свободных аминокислотных остатков (молекул метиламидов N-ацетил- α -аминокислот). Наборы лучших по энергии оптимальных состояний простых фрагментов служат исходными для формирования нулевых структурных вариантов более сложных фрагментов и т.д. В основе метода лежит построенная по принципу "дерева" классификация пептидных структур на конформации, формы и шейпы. Предложенная классификация полностью отвечает известным эксперимен-

тальным данным, обоснована с физической точки зрения и охватывает все возможные пространственные структуры аминокислотной последовательности (см. гл. 7).

8. Метод теоретического анализа использован для расчета пространственного строения природных пептидных антибиотиков, гормонов и их синтетических аналогов, содержащих от 5 до 30 аминокислотных остатков. На основе сопоставления теоретических и опытных данных изучены конформационные возможности олигопептидов. Для апробации физической теории структурной организации пептидов и метода расчета их конформационных возможностей использованы три способа. Первый из них связан с прямым сравнением теоретических и опытных значений геометрических параметров молекул. Во всех случаях, где такое сопоставление оказалось возможным, наблюдалось хорошее количественное согласие результатов теории и опыта. Второй способ имеет вероятностный характер и не требует для оценки достоверности результатов расчета знания экспериментальных фактов. Он основан на выборе для теоретического исследования объектов, расчет которых содержит внутренних, автономный контроль. Такими объектами могут служить пептиды, содержащие остатки цистеина, далеко расположенные друг от друга в цепи и образующие между собой дисульфидные связи. Априорное исследование ряда цистеинсодержащих пептидов, аминокислотные последовательности которых включали от 18 до 36 остатков, автоматически привело к выяснению пространственной сближенности остатков $S_{\alpha}S_{\beta}$, отвечающей правильной системе дисульфидных связей. Наконец, третий способ проверки заключался в сопоставлении данных конформационного анализа белковых фрагментов с геометрией соответствующих участков трехмерной структуры белка, установленной с помощью рентгеноструктурного анализа. И здесь были подтверждены достоверность и высокая точность результатов априорного расчета (см. гл. 8–13).

9. Знание конформационных возможностей природных олигопептидов позволило сформулировать общие для их структурной организации черты. Получено представление о важной роли в структурной организации молекул средних взаимодействий. Оказалось, что в каждой последовательности имеются участки, конформационные состояния которых определяются взаимодействиями лишь входящих в них аминокислотных остатков. Наряду с конформационно жесткими есть лабильные участки, в которых средние взаимодействия не детерминируют их состояния полностью, а только сужают круг их возможных структурных вариантов (см. гл. 14).

10. Детальное изучение конформационных возможностей природных олигопептидов сделало реальным переход к априорному расчету трехмерной структуры белков. Первый шаг в этом направлении заключался в теоретическом исследовании конформационных возможностей свободного фрагмента из 23 аминокислотных остатков белка нейротоксина II. Конформация данного фрагмента нейротоксина II практически полностью совпала с известной геометрией соответствующего участка 1–24 гомологичного белка эрабутоксина *b*. Таким образом, расчет доказал, что механизм спонтанной и безошибочной сборки белковой цепи заключается в неза-

висимом образовании стерически комплементарных друг другу конформационно-жестких нуклеаций и последующем объединении в нативную трехмерную структуру макромолекулы без существенных изменений геометрии. Исследованы конформационные состояния фрагмента 1–23 у пяти гомологичных нейротоксину II белков, имеющих на этом участке ряд аминокислотных замен. Из расчета выяснено, что различия в последовательностях фрагментов не сказываются на форме пептидного остова и не изменяют условий образования дисульфидного мостика Cys³–Cys²³. Все остатки гомологов свободно встраиваются в глобальную для нейротоксина II циклическую трехмерную структуру, не вызывая ее дестабилизацию. Принимаемые в некоторых случаях новыми остатками иные положения боковых цепей при сохранении формы основной цепи также отвечают областям низкой энергии χ_1 – χ_2 заменяемых остатков нейротоксина II, которые в новых условиях оказываются более предпочтительными. Рассчитанная геометрия белкового остова предоставляет возможность реализации у различающихся аминокислот в эволюционно отобранных последовательностях нейротоксинов ряда конформационных состояний. Для всех гомологов найденная структура фрагмента 1–23 нейротоксина II является глобальной (см. гл. 15).

11. Решающим доказательством справедливости предложенного подхода к решению задачи о структурной организации белка явились результаты априорного расчета трехмерной структуры бычьего панкреатического трипсинового ингибитора и количественное представление свертывания белковой цепи как самопроизвольного, быстрого и безошибочного процесса. Рассчитанная при использовании аминокислотной последовательности и стандартной валентной схемы конформация белка совпала с кристаллической структурой молекулы БПТИ. Точность расчета значений всех двугранных углов вращения ϕ , ψ , ω и χ , расстояний между атомами C ^{α} всех остатков и длин реализуемых водородных связей оказалась близкой точности рентгеноструктурного анализа белков высокого разрешения. На основе данных о конформационных возможностях аминокислотной последовательности БПТИ получили свое объяснение все детали ренатурации белка, механизм которой был изучен экспериментально. Тем самым, во-первых, была подтверждена неравновесная термодинамическая модель сборки белка. Во-вторых, была апробирована физическая теория структурной организации белка, вскрывающая природу бифуркационных флуктуаций и утверждающая представление о нативной конформации белковой молекулы как о глобальной по внутренней энергии структуре, плотнейшим образом упакованной и согласованной в отношении всех своих внутримостаточных и межостаточных невалентных взаимодействий. Именно гармония между ближними, средними и дальними взаимодействиями ответственна за резкую энергетическую дифференциацию и выделение из множества возможных структурных вариантов стабильной и уникальной для данной аминокислотной последовательности конформации белка. В-третьих, продемонстрированы реальность фрагментарного метода теоретического конформационного анализа пептидов и белков и удовлетворительное количественное описание с его помощью их пространственных структур применительно к условиям полярной среды. Под-

тверждены механическая модель молекулы и полуэмпирические потенциалы ван-дер-ваальсовых, электростатических, торсионных взаимодействий атомов и водородных связей, а также выбранная система параметризации. В результате проведенного исследования получены ответы на следующие вопросы проблемы белка, не находившие ранее своих решений: каким образом беспорядочные и случайные конформационные флуктуации статистического клубка приводят к появлению и развитию спонтанного процесса формирования высокоорганизованной трехмерной структуры белка; чем обусловлена высокая скорость беспорядочно-поискового механизма сборки белковой цепи; в чем причина безошибочности процесса структурной организации белка (процесса, включающего только случайные и беспорядочно возникающие флуктуации), результатом которого всегда является свертывание одинаковых аминокислотных последовательностей в идентичные пространственные структуры (см. гл. 16).

12. Рассмотрен подход к решению обратной структурной задачи, основанный на физической конформационной теории природных пептидов и белков, прежде всего оценке особой роли ближних взаимодействий в их структурной организации и использовании классификации пептидных структур на шейпы, формы и конформации. Показано, что можно добиться целенаправленного и контролируемого изменения структуры пептида за счет ближних взаимодействий простыми средствами, выработанными в процессе эволюции органического мира. Изложенный в книге подход к решению обратной задачи позволяет заранее, еще до синтеза и биологических испытаний целенаправленно конструировать модели искусственных аналогов, пространственные структуры которых отвечают низкоэнергетическим и физиологически активным конформационным состояниям природного пептида. Возможности теоретического моделирования искусственных аналогов продемонстрированы на конкретных примерах. Полученные результаты подтверждают необходимость его использования в изучении молекулярных механизмов функционирования пептидных гормонов, катализа ферментов, взаимодействий антител с антигенами и т.п. (см. гл. 17).

* * *

Изложенный в книге материал позволяет, по моему мнению, утверждать, что в настоящее время имеется объективное представление о принципах укладки белковой цепи в нативную трехмерную структуру и на их основе создан расчетный метод предсказания геометрии белковой глобулы и ее динамических конформационных свойств исходя только из аминокислотной последовательности. Проведенное обсуждение физических аспектов проблемы белка, соответствующих количественных экспериментальных данных и результатов априорных расчетов конформационных состояний природных олиго- и полипептидов сделало возможным объяснить причины протекания самопроизвольного, быстрого и безошибочного процесса свертывания белковой цепи в детерминированную трехмерную структуру. Знание (и понимание) структурной организации пептидов и

белков позволяет принципиально иным образом поставить проблему структурно-функциональной организации этих соединений, что приведет к получению ранее недоступной информации о механизмах процессов жизнедеятельности и сделает реальным становление теоретической молекулярной биологии, не уступающей по строгости своих подходов и предсказательным возможностям теоретической молекулярной физике. Однако я далек от мысли, что теоретическая разработка проблемы структурной организации белков уже завершена и предложенный метод расчета нативных конформаций белковых молекул не нуждается в совершенствовании. Представленные в книге разработки рассматриваются мною как введение, предваряющее и подготавливающее создание экспрессных методов анализа конформационных возможностей пептидов и белков.

Высоко оценивая значимость кристаллографических и иных опытных данных о белках, следует тем не менее иметь в виду их принципиальную недостаточность в решении ряда общих и многих конкретных вопросов структурной и структурно-функциональной организации. Поэтому теоретический конформационный анализ неизбежно должен стать неотъемлемой составной частью всех исследований морфологических и биологических свойств белковых молекул. Для этого необходимо, чтобы расчетный метод был бы менее трудоемким и более быстрым, чем изложенный в книге метод априорного расчета. Надежность существующего метода подтверждается хорошим совпадением результатов расчета с опытными данными. Точность рассчитанных априорно координат атомов нейротоксина II и панкреатического трипсинового ингибитора не уступает точности рентгеноструктурного анализа белков с разрешением $\sim 2,0 \text{ \AA}$. О его скоростных качествах можно судить по следующему примеру. Так, полный расчет трехмерной структуры белка, имеющего ~ 100 аминокислотных остатков, проводится двумя-тремя сотрудниками, владеющими методом, с помощью двух современных персональных компьютеров за ~ 4 месяца.

В настоящее время, когда эта цель достигнута, наступил период реализации приобретенного научного потенциала в изучении структурно-функциональной организации белков и в прикладных исследованиях. Сфера последних – почти все разделы молекулярной биологии и молекулярной генетики, а также фармакология, эндокринология и многие другие области научной медицины. Поэтому требуется разработка нового метода, который не уступал бы точности и надежности первого, но обладал бы большей эффективностью и автоматизмом.

Высказанные ниже соображения о направлении поиска подсказаны результатами проведенных исследований и опытом, приобретенным при расчете первых белков и многочисленных пептидов. Можно считать доказанным, что важнейшая особенность природных аминокислотных последовательностей, ответственная за спонтанное возникновение высокоорганизованной пространственной структуры из хаоса, заключена в химической гетерогенности полипептидной цепи. Гетерогенность аминокислотной последовательности, прошедшей через эволюционный отбор, порождает ее конформационную неоднородность и появление бифуркационных флуктуаций, структурирующих молекулу белка. Можно также считать бесспорным, что конформационная неоднородность природной аминокислот-

ной последовательности проявляется в чередовании жестких и лабильных олигопептидных участков. Геометрия первых практически полностью определяется взаимодействиями входящих в них остатков; вторые же обретают свою окончательную форму на завершающем этапе сборки под влиянием дальних взаимодействий, т.е. взаимодействий с остатками других участков. Чередование конформационно жестких и лабильных фрагментов превращает процесс свертывания белковой полимерной цепи в ряд параллельно идущих процессов самоорганизации жестких структур олигопептидных участков, которые сначала практически не контактируют друг с другом. Затем происходит их взаимодействие между собой и с конформационно лабильными участками, что приводит в конечном счете к детерминации всей пространственной структуры белка. Основная идея нового метода заключается в приближении расчетной схемы к естественному механизму структурной самоорганизации белковой цепи. Конкретно это означает, что расчет трехмерной структуры белка должен начинаться с анализа конформационных возможностей всех свободных жестких и лабильных фрагментов. Сложность заключается в том, что для этого необходима предварительная идентификация тех и других по одной аминокислотной последовательности, т.е. выявление конформационной гетерогенности белковой цепи не в процессе расчета, как в существующем методе, а до детального анализа. Появление такой возможности сократило бы в десятки раз объем вычислительных работ, упростило бы саму процедуру счета и сделало бы метод конформационного анализа пептидов и белков доступным широкому кругу молекулярных биологов для решения множества прикладных задач.

Достичь этой цели, т.е. предсказания по аминокислотной последовательности конформационно-жестких и лабильных участков, можно тремя способами. Один из них универсален, а два других, хотя и имеют частный характер, представляют самостоятельный интерес и могут дополнять и контролировать друг друга. Первый способ требует распределения пространственного строения пептидных участков фиксированной длины по определенным таксономическим группам – шейлам, обобщенным структурным элементам цепи, отражающим потенцию соседних остатков к средним взаимодействиям. По ряду причин оптимальными являются пентапептидные участки. Их структурная селекция по шейлам может быть осуществлена с помощью "скользящей рамки" с шагом в один остаток для всех белков, нативные конформации которых известны. Максимально возможное число шейпов у фрагмента из n остатков равно 2^{n-1} ; при $n = 5$ оно составляет 16. Можно надеяться, что систематика белковых пентапептидных участков, количество которых превышает 100 тыс., по 16 группам и последующий анализ каждой группы приведут к установлению корреляций между составом и порядком аминокислот в пентапептидах, с одной стороны, и шейлам основной цепи, с другой. Такие корреляции, очевидно, не будут однозначными, и для большинства пентапептидов приемлемыми окажутся три-четыре, а то и большее число шейпов. Специальные расчеты, однако, показали, что и в этом случае конформационно-жесткие участки смогут обнаружиться по тенденции к снятию энергетического вырождения шейпов фрагментов, перекрывающихся по 1–4 остат-

кам, а конформационно-лабильные – по отсутствию их заметной дифференциации по шейпам.

Второй способ идентификации участков требует привлечения гомологичных белков. Он основывается на предположении, что разные по жесткости фрагменты белковой цепи неодинаково чувствительны к аминокислотным заменам. Можно полагать, что у конформационно-лабильных фрагментов мутации более вероятны, чем у жестких. Структурирование последних происходит на самой ранней стадии сборки и только за счет стабилизирующих контактов между близкорасположенными по цепи остатками. Такие взаимодействия по сравнению с контактами внутри лабильных фрагментов должны быть гораздо более избирательными, а, следовательно, остатки жестких фрагментов более консервативными.

Третий способ основывается на контактных картах Кунтца, в наглядной форме представляющих расстояния между всеми аминокислотными остатками (атомами C^α) в трехмерной структуре белка. Здесь можно надеяться, что анализ большого количества таких карт позволит обнаружить отличительные признаки конформационно-жестких и лабильных участков.

ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Абагян Р 243
Абдергальден Э 62
Абе Г 492, 493
Абель Р 336
Александров А Д 14, 15, 18
Алексеев В П 37
Амброзе Е 70, 71
Ансон М 82
Анфинсен К 240, 290, 292, 317
Аргос П 511
Астбэри У 68, 69, 71, 427, 520
Ахмедов Н А 363
- Байрох А 518
Балодис Ю 348
Бартон Д 110, 111
Батлер Дж 72
Баук З 189
Бауэр Э 240
Баш Г 138
Бейлисс В 371
Беккерель А А 15
Бекманн Б 518
Бергман М 62
Бердяев Н А 13–15
Берендсен Х 244
Бернал Дж 70, 72, 94, 427, 520
Биксон М 116
Бирштейн Т М 101
Бланделл Т 373, 384, 522, 523
Бодански М 372, 373
Бойль Р 25
Болдвин Р 494
Больцман Л 47, 90, 92
Бор Н 130
Брандтс Дж 83, 85, 493, 495, 499
Брант Д 115, 117, 122, 156
Брахмачари С 304
Брегг Л 520
Бредбэри А 343
Бригль П 63
Брилл Р 67
Брэгг Л 70–72
Брэдбери Е 145
Брюнгер А 525
Букингем А 114, 115
Булгаков С 40, 41, 48
Бусетта Б 511
- Бутлеров А Н 60
Быстров В Ф 175, 304 305
Бэкон Ф 12, 529, 530
Бэмфорд С 70
Бэржес А 500–503, 509, 510, 518
Бюффон Ж 12
- Вавилов Н И 18
Вальдшмидт Лейтц Э 66, 427
Вальстром А 338
Вальтер Р 393
Вант-Гофф Я 60
Васкес М 240, 242, 245
Вернадский В И 12, 18, 25, 28–30, 35–40
Викар Дж 389
Вильсон Э 131, 138, 164
Винер Н 47
Винсент Дж 293
Волькенштейн М В 101, 505
Вольтц Д 516
Ву Т 286, 502
Вуд С 373, 384
Вудворд Р 70
- Габел Д 487, 488
Галактионов С Г 281, 282, 389, 393–397
400, 401, 534, 536
Галилей Г 17
Гальвани Л 15
Гамильтон У 17, 22
Ганн Дж 489
Гарнье Дж 516
Гейглер В 66
Геккель Э 14
Гелин Б 526
Гернгросс О 68
Герц А Г 15
Герцог Г 67, 68
Ге Н 490–495, 498
Гете И 16, 41
Гиббс 101, 102, 174, 380
Гибрат Дж 516
Гленсдорф П 47
Гогитидзе Т В 271, 281 569
Голдберг Д 246
Голдштейн А 338
Гранье К 293
Граф Л 338

- Грибов Л.А. 235
 Гринфилд Н. 304
 Грир Дж. 510, 522
 Гудман М. 172, 389
 Гутин А. 496
- Дайзенхофер Дж. 136, 428
 Дальтон Д. 28
 Данилевский А.Я. 61
 Дарвин Ч. 28, 30, 47, 48
 Даулинг Дж. 131, 140
 Дашевский В.Г. 113, 115, 116
 Дебай Д. 66
 Дейвис М. 131
 Декарт Р. 17
 Де-Коэн Дж. 282, 346, 389, 392–394, 401
 Де Сантис П. 122, 124, 156, 395
 Деслортерс Р. 344, 356
 Джакеш Дж. 145
 Джеймс М. 524
 Джерниган Р. 488, 489, 497
 Джинс Дж. 117
 Джогерсен Е. 280
 Джонс Т. 114, 115, 124, 523
 Джонс Ч. 343
 Джонсон Л. 286
 Джорпес Дж. 372, 389
 Дигерт М. 395
 Дилл К. 495, 498
 Догерти Д. 197
 Достоевский Ф.М. 16, 528
 Дю Виньо В. 336
- Ёнода Ш. 348
- Желтова В.Н. 118
- Завальный А.А. 414, 522
 Зайцев Б.К. 18
 Заксе Г. 110
 Зелинский Н.Д. 62, 64
 Зигфрид М. 61
- Идлис Р.Г. 531, 532, 537–543
 Изогаи У. 346–348
 Илиел Э. 113
- Каба Е. 286, 502
 Канехиса М. 493
 Капица П.Л. 14, 15, 18
 Карле И. 344
 Карплюс М. 494–496, 526
 Каррер П. 62
 Кассел Б. 428
 Катц Дж. 68, 145
 Катчальский Э. 189
 Квадрифоглио Ф. 169
 Квиан Н. 516
 Кеезом В. 66
 Кемп Дж. 120
- Кендрю Дж. 70–72, 108, 538
 Керл Дж. 121
 Керл Р. 132, 133
 Ким П. 494
 Кирквуд Дж. 114, 117
 Кистяковский Г. 120
 Китайгородский А.И. 112, 113, 115, 116
 Клаузиус Р. 23, 47
 Клер Л. 389
 Клотц Т. 160
 Кнеллер Д. 516
 Ковел Д. 497
 Козман У. 6, 72, 78, 95, 239, 510, 519, 538
 Койре А. 25, 529
 Колинский А. 497
 Колленбах Н. 305
 Коллет Дж. 71
 Корана Г. 527
 Кори Р. 70, 71, 108, 109, 155, 156, 158, 176, 239, 470, 510, 512, 519, 538, 540
 Корреа П. 525
 Коссель В. 61
 Кост С. 516
 Костейн С. 131, 140
 Котельчук Д. 287, 500
 Коулсон Ч. 116, 123, 138
 Кох Б. 338
 Коэн К. 507
 Коэн Ф. 507, 508, 510, 513, 516
 Кратки О. 68
 Краффт С. 63
 Крейтон Т. 82, 86, 428, 438, 444, 472, 473, 475, 477, 478, 480–482
 Кривой М. 114
 Крик Ф. 108, 427, 528, 538
 Кримм С. 119, 161
 Криппен Г. 245
 Кромхаут Р. 124
 Кузнецов И.В. 37
 Куксон Р. 111
 Кунтц И. 485, 487, 492, 508, 510
 Курланд Р. 131, 138, 164
 Куэблер Н. 138
 Кэбш У. 511, 513, 526
 Кювье Ж. 47
 Кюне В. 62
- Лавуазье А. 28
 Лагранж Ж. 22
 Ладелл Дж. 131
 Ламарк Ж.Б. 11
 Ламберт М. 244, 245
 Ламри Р. 101, 102, 239
 Лангридж Р. 516
 Ландау Л.Д. 22
 Лаплас П. 22
 Ласковский М. 428
 Ле Бель Ж. 60
 Левин Дж. 516

Левин П 59
 Левинталь К 240, 524
 Левитт М 136, 304, 484, 485, 487, 497, 507, 508, 510, 523, 524, 526
 Ленгмюр И 63, 72, 538
 Ленард Джонс Дж 66, 114, 115, 124
 Ленстра Дж 511
 Леопольд П 495, 496
 Леск А 518, 523, 524
 Лещинский Дж 513, 514
 Ли З 242, 243, 349, 350, 351
 Ли С 338
 Либих Ю 529
 Ликвори А 115, 395
 Лим В И 86, 500, 511
 Линдерстрем-Ланг К 71, 72
 Линдли Г 71
 Липкинд Г М 249
 Липкомб У 120, 121
 Липпинкот Э 123, 124, 156
 Лифсон С 116, 136, 510
 Лифшиц Е М 22
 Лифшиц И М 101
 Ломизе А Л 306
 Лондон Ф 66, 113, 114
 Лоу В 71
 Луо Н 525
 Льюис П 510
 Лэн Дж 132
 Лэнгсет А 121
 Лэттман Е 82
 Любимова М Н 68
 Майер Дж 112
 Мак-Клеллан О 176
 Маклин Р 516
 Максвелл Дж 15
 Максфилд Ф 516, 518
 Марк Г 67, 68, 520
 Марк Дж 119, 161
 Маршалл Г 279, 395
 Маулт Дж 524
 Маултон У 124
 Медисон В 172
 Мейер К 67, 68, 520
 Мейзон Е 114
 Меклер Л Б 5, 530–534, 536–543
 Мельников П Н 293
 Менделеев Д И 19, 24
 Мень А 39
 Месиров Дж 516
 Метрополис Н 243
 Мидзусима С 70, 121, 159, 168, 234
 Микулинский С Р 37
 Милберг М 120
 Мирошников А И 293
 Мирский А 82
 Мишер Ф 59
 Миязава С 488, 489, 497

Момани Ф 347, 348, 393–395, 525
 Мор Э 110
 Морзе П 125, 157
 Мульдер Г 60, 61, 64, 529
 Мур В 176
 Мур С 67
 Мэгре Б 394
 Мэтесон Р 495
 Мэтьюз Б 517

Нагано К 511
 Наканиши С 362
 Номура М 53, 54
 Немети Г 240, 242, 245, 500, 501, 518
 Нигашияма И 344
 Никифорович Г В 333, 569
 Нилгес М 525
 Ниренберг М 527
 Нишикава К 511, 525
 Нортроп Дж 66
 Ньютон И 22, 23, 28

Онсагер Л 91
 Орего К 518
 Орт У 498
 Осгурторп Д 508, 516

Павлов И П 28
 Палмер К 524
 Парри Д 507
 Пейн П 525
 Пейн Р 502
 Перутц М 70–72, 538
 Пиела Л 245
 Пиментел Дж 176
 Питцер К 113, 120, 121
 Поланд Д 118, 124, 139
 Полинг Л 66, 70, 71, 108, 109, 121–123, 125, 148, 150–156, 158, 176, 239, 470, 510, 512, 519, 520, 538, 540
 Полозов Р В 113
 Поннусвами П 510
 Попов Е М 118, 119, 249, 326, 363
 Портнова С Л 175
 Пост Б 131, 145
 Премила С 394
 Пригожин И Р 10, 21–23, 27, 39, 41, 42, 47, 49, 88, 91, 92
 Птицын О Б 101, 500, 503–506, 516
 Пуанкаре 18
 Пульман А 112
 Пульман Б 112, 172
 Пурисима Е 245, 524
 Пфлюгер Э 64

Рабер Д 243
 Рамачандран Г 113 122, 155, 156, 190
 Рагнарссон У 304
 Райли Р 70

Рапли Дж. 539
 Раузе Г. 82, 510, 513, 514
 Рашин А. А. 503
 Резерфорд Э. 18
 Рей А. 525
 Рейс К. 292
 Ринч Д. 63
 Риполл Д. 351
 Ристоу С. 240
 Ричардс Ф. 508
 Ричардсон Д. 512
 Ричардсон Дж. 512
 Ричмонд Р. 508
 Робин М. 138
 Робсон Б. 502, 508, 511, 514–516
 Роджес Б. 343
 Ролстон Э. 393, 394
 Рост Б. 516–519

Садиков В. С. 62, 64
 Салем Ф. 524, 526
 Саммерс Н. 526
 Самнер Дж. 66
 Сандер К. 510, 511, 513, 516–519, 524, 526
 Сасисекхаран В. 113, 122
 Саундерс М. 243
 Седжновский Т. 516
 Селтцер Дж. 510
 Сенгер Ф. 67, 427
 Сент-Дьерди А. 89
 Симантов Г. 338
 Скольник Дж. 495–497, 525
 Скотт Р. 114–116, 119, 121, 122, 324, 395
 Смит Г. 344
 Смит Л. 120
 Снейдер С. 338
 Сноу М. 244
 Соколов Н. Д. 123
 Солженицын А. И. 39
 Соловьев Вл. С. 14, 44
 Сольцберг С. 516
 Спасов В. З. 326
 Спирин А. С. 53, 55
 Спиртс М. 344
 Сринивансан Р. 500
 Старлинг Э. 371
 Стейгеманн У. 136, 428
 Стейн У. 67
 Стенгерс И. 21, 39, 41, 49
 Стернберг М. 507, 508, 510
 Стиллингер Ф. 497
 Сузиху Н. 68

Такетомп Г. 490–493, 498
 Танака С. 486, 487, 489, 511
 Тейлор У. 508, 518
 Тейяр де Шарден П. 11, 16, 30–40
 Терениус Л. 338
 Тешемахер Г. 338

Тимирязев К. А. 15, 19, 20, 46
 Тируп С. 33
 Толстой Л. Н. 13, 18
 Томпсон У. 22, 47
 Торнтон Дж. 507
 Тотров М. 243
 Трензлер Н. 62
 Тсонг Т. 43

Уей Ч. 97
 Уендолмай Дж. 524, 526
 Уетлауер Д. 240
 Уивер Л. 94
 Уилсон Э. 21
 Уолтер Р. 187
 Уоршен А. 484, 495, 487, 508
 Уотсон Дж. 108, 427, 528
 Урри Д. 19
 Утетева Э. 365
 Уэйнман Р. 280
 Уэммер Д. 305
 Уэстгеймер Ф. 112, 113, 117

Фаради М. 15
 Фасма Г. 72, 304, 502, 507, 510, 511, 516
 Фергюсон Д. 243
 Фермацан С. 280, 365
 Фершл А. 82, 87
 Филлис Д. 72, 74, 108
 Финкельштейн А. В. 500, 516
 Фишер Э. 62–64, 427
 Фларри Р. 101, 115, 117, 122, 156, 389
 Флаулер Р. 94
 Фодора Б. 62, 63
 Форрест С. 246
 Франк Л. 160
 Франк Л. 2
 Франклин Б. 15
 Франклин И. 70
 Фрид Л. 172
 Фриман К. 304

Хаггис М. 69, 70, 71, 520
 Хайек Ф. А. 44
 Халед М. 343
 Хао М. 46
 Харри Г. 121
 Харри Ф. 121
 Хельд Г. 3
 Хендриксон Дж. 114
 Хеннигс Б. 286
 Хид-Гардн Т. 497
 Хидер Р. 104
 Хилл Л. 112, 114
 Хиндс Дж. 197
 Хирс Л. 6
 Ходжсон Дж. 70
 Холден Дж. 49
 Холли Р. 127

Холм Л. 524
Хоспитал М. 511
Храбли В. 365
Хубер Р. 428
Хунд Ф. 66
Хьюгэс Э. 176
Хьюз И. 338
Хэберманн Е. 292
Хюккель Э. 66, 389

Цан Г. 70
Циолковский К.Э. 45
Цханг Х. 516

Чанг Г. 243
Чанг Д. 338
Чаргафф Э. 59, 108, 528
Чижевский А.Л. 43
Чипенс Г.И. 365, 399, 400
Чиполини Р. 292
Чотиа К. 507, 518, 523, 524
Чоу П. 304, 502, 510, 511, 516

Шавлик Дж. 516
Шахнович Е. 495, 496
Швани Т. 28
Шеллман Дж. 71, 160, 171, 172
Шейдер Б. 145
Шерага Г. 113–116, 118, 119, 121, 122, 124, 139, 156, 157, 169, 172, 240, 242–245, 279, 282, 287, 324, 349–351, 389, 392, 393, 395, 401, 486, 487, 489, 495, 496, 500–503, 509–511, 516, 518, 523–525

Шеффер П. 68
Шиманучи Т. 70, 159, 234
Ширмер Р. 517
Шлейден М. 28
Шнейдер Р. 516–518
Шрам К. 70
Шредер Р. 123, 124, 156
Шредингер Э. 51, 102
Шталь Г. 25
Штаудингер Г. 63
Штокмайр У. 124
Шульц Г. 517
Шютценберже П. 61

Эванс Дж. 131
Эвери О. 59
Эддингтон А. 21, 47, 76
Эдзал Дж. 72
Эйген М. 89
Эйнсворт Дж. 120
Эйнштейн А. 14, 17, 19
Эйринг Г. 101, 102, 120, 121, 239
Эллиот А. 70, 71, 145
Энгельгардт В.А. 68
Эрберт Л. 120
Эрстед З. 15

Юдаев Н.А. 365

Ямада Т. 389
Янске У. 67, 68
Яншин А.Л. 37

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Аденилаткиназа 517
Актин, комплекс с дезазой I 526
Аламетидин 395
Алгоритм программы расчета конформаций 233–238
Аминоацилсинтетаза 55
Аминоацил-тРНК-синтетаза 53
Ангиогенин 522
Ангиотензин II 269–282, 286, 287, 291, 385, 389, 394, 555, 567–576
Апамин 288, 291–306, 312, 317, 325, 385
Апомиоглобин 503
Апопластоцианин 497
Барназа 87
Белок(ки) (см. также по названиям)
– CD-антигенов 522, 523
– вирусов 506, 513
– глобулярные 69, 71
– денатурация–ренатурация 69, 81, 84, 471, 490, 495
– кристаллография 74, 76
– позвоночных 506
– прокариотов 506
– структурная организация 59–125
– – классификация 71, 73, 78, 221–233
– – механизм 109
– – трехмерная 64, 67–75, 78, 414, 418, 424, 426, 427, 472
– человека 506
Биогенез 33
Бифуркационная флуктуация 27–29, 46, 96, 109
Брадикининпотенцирующие пептиды
– аналоги 256–269, 291, 306, 555–560, 576
– пространственные структуры 256–269
Вазопрессин 328, 333–336, 385, 389
Вазотоцин 333–336, 385
Валиномицин 285, 287
Взаимодействие(я)
– ближние, средние, дальние 105, 109, 181, 220, 291, 306, 309, 315, 321, 336, 587, 588
– ван-дер-ваальсовы 113–116, 157, 178, 186
– дисперсионные (лондоновские) 186, 341, 342, 356, 367, 368, 370, 379
– торсионные 120–122, 157, 178, 324, 341, 342, 367
– электростатические 116–120, 157, 178, 186, 341, 342, 356, 367, 368, 370, 379
Водородная связь 122–125, 157, 186, 341, 342, 356
Гастрин 372
Гемоглобин 70, 527, 528, 539
– атомная модель молекулы 72
Гистоны 52
Глюкагон 372, 373, 384, 516
Гормоны
– адренокортикотропный 338, 362, 365
– меланоцитстимулирующие 362
– нейрогипофизарные 325, 328, 329, 333
Грамицидины 385, 395
– S 285, 288, 395
Двойная спираль ДНК Уотсона–Крика 52, 55, 108
ДНК, структурная организация и конформационные возможности 52
Диметиламид N-ацетил-L-аланина 167, 168, 183, 185
Динорфин 338, 339
Иммуноглобулины 523
Ингибитор(ы)
– Баумена–Бирка 506
– трипсиновый 525
Инсектотоксин I₁ 291, 292, 317–325, 385
Инсулин 71, 506, 516
Кальмодулин 305
Карта(ы)
– Кунтца 487, 594
– Рамачандрана 154–192, 488
– RR 526
Кератин 72
Код(ы)
– генетический стереохимический 8, 527–543
– генетический химический 527, 530, 531, 533
Кодеин 336
Коллаген 68, 69
Комплемент C5a 522
Конформация молекул 110
Крамбин 516

α -Лактальбумин 70, 521
 α -Латикпротеаза 525
 Лиганды опиатные 338–340
 Лизоцим 73, 74, 108, 181, 184, 500, 501, 508–510, 517, 521, 539
 β -Липотропин 338, 362, 506
 Люлиберин 393, 394

Мезотоцин 328, 333–336, 385
Меланотропины 362–370, 386, 389
 – α - 362–365, 370
 – β - 362, 363, 365–370
 – γ - 370
Мелиттин 395
Метиламиды N-ацетил- α -аминокислот, конформации 109, 129, 154, 157–166, 181, 317, 329, 340, 358
Метиламиды N-ацетилди- и трипептидов, конформации 190–219
N-Метильные производные метиламидов N-ацетил- α -аминокислот, конформации 167–172
Метод(ы)
 – атом-атомных потенциалов взаимодействий 587
 – генно-инженерный получения аминокислотных последовательностей в ауксотрофных клетках 74
 – деформации с одновременной минимизацией энергии 242, 243
 – диффузионного сглаживания потенциальной поверхности 245
 – минимизации Монте Карло 243, 245, 349–351, 394, 486, 487, 489, 491, 495, 496, 524
 – молекулярной динамики 244, 373
 – мультиволновой аномальной дифракции 74
 – наращивания пептидной цепи 241
 – поляризационный ориентации диполей 243
 – рентгеноструктурный 70–75
 – решения обратной структурной задачи 90
 – самосогласованного электрического поля 243
 – статистической информации 244
 – стохастический Саундерса 243
 – температурного "отжига" 243
 – теоретический конформационного анализа пептидов и белков 219–249
 – энергетических вставок 245
 – ЯМР 75
Миоген карпа 485
Миоглобин 489, 506, 508, 528, 539
 – атомная модель молекулы 72, 181, 184
Модель(и) полипептидов
 – диффузионно-коллизонная 86
 – каркасная 86
 – Кендрию–Уотсона 108
 – механическая 112, 113
 – Резерфорда–Бора 20

– резонансная Полинга 150
 – β -складчатый лист 70, 73, 83, 193
 – α -спираль 70, 73, 83, 193
Морфин 336, 338, 343

Напряжение

– байеровское 110
 – питцеровское 110
Нейраминидаза 513
Нейромедиаторы 338, 363
Нейромодуляторы 338, 363
Нейропептиды 336, 338, 339, 352
Нейротоксин
 – CM-14 424, 425
 – II 181, 182, 184, 414–426, 465, 470, 474, 482, 488, 521, 522, 549, 589, 590
 – 4 424
 – a 414
 – b 414
 – D 424, 425
 – α 424
 – β 424, 425
Неоэндорфин (α -, β -) 338, 339, 386
Ноогенез 33
Ноосфера 30, 36, 38
Нуклеосома 53

Окситоцин 286, 287, 326–336, 389
 – конформационный анализ 329–336
Олигопептиды 256–413
 – структурная организация 384–406
 – цистинсодержащие 335, 418, 422, 426, 589

Панкреатический трипсиновый бычий ингибитор (БПТИ) 86, 181, 184, 387, 426–482, 485, 487, 488, 502, 503, 506, 509, 521, 522, 590
 – денатурация–ренатурация 471–482
 – дисульфидные связи 457–460
 – трехмерная структура 457, 472
Панпсихизм 31
Папаин 510
 – трехмерная структура 74
Пепсин 70, 506, 546
MCD-Пептид 291, 292, 304, 306, 312–317, 325, 385
Пептид δ -сна 555, 560–567, 570
Потенциал
 – Букингема 114, 115, 157
 – Китайгородского 115
 – Леннарда–Джонса 114, 115
 – Ликвори 115
 – Липпинкота–Шредера 156
Принцип
 – Борна–Оппенгеймера 112, 116
 – Паули 114, 122
 – структурной организации белка 105
Протеиназы аспартатные 522, 526, 546, 547
Психогеenez 33

Ренин человека 522
 Рецепторы опиатные 335, 336, 339, 347
 - лиганды 335, 338, 339
 Рибонуклеаза 71, 522
 - трехмерная структура 74
 РНК, пространственная структура 53
 Рубредоксин 181, 182, 184, 486
 Самосборка полипептидной цепи 6
 Свертывание белковой цепи 81–88
 - механизм 247
 - модель(и) свертывания белка
 - бифуркационная термодинамическая 472, 473
 - глобулярная 492, 493
 - кластерная 493, 494
 - неравновесная термодинамическая 93–95, 426, 482
 - общая физическая 503, 504
 - решетчатая 490, 491, 494–499
 - статистико-механическая 492
 - теоретические 484–500
 - экспериментальные 520–527
 - эмбрионуклеационная 494
 - эмпирические 500–520
 - GOR I (II, III) 514, 515
 Секретин 371–384, 387
 функции 372
 структурные исследования 372–384
 Стафилококковая нуклеаза, трехмерная структура 74
 Структурная организация белка
 гипотеза(ы)
 - гидрофобная Козмана 73, 78
 - кинетическая Уетлауфера и Ристау 240
 - о генетическом стереохимическом коде 527–543
 - протамниновая 61
 - расплавленной глобулы 84
 - термодинамическая Анфинсена 239
 - уредная 61
 - Фодора 63
 - циклольная Ринч 63
 - α -спиральная Полинга 71, 72, 78
 - теория(и)
 - Бергмана 63
 - бифуркационная 7, 8, 88–100, 248, 413, 414, 425, 465, 473, 521, 523, 587
 - гидантоиновая 63
 - дикетопиперазиновая 62, 64
 - диссипативных самоорганизующихся структур 88, 91
 - Каррера 62
 - неравновесная термодинамическая 479, 577
 - пептидная Фишера и Вальдшмидт-Лейнда 62, 66, 67
 - протеиновая 60
 - равновесных процессов 473

-- спиразиновая 63
 - - термодинамическая двух состояний Брандтса 85
 - - Трензегора 62
 - физическая 89, 100–109, 247, 414, 425, 465, 472, 474, 479, 482, 521, 548, 587, 588
 - химическая 59–67
 - - теория "элементарных рядов" 61
 Субтилизин BPN' 510

Тахиплезин 540–542
 Термолизин 513
 Тertiалин 291, 292, 304–313, 316, 317, 325, 385
 Тетрагастрин 389, 392
 Тиролиберин 389
 Триозефосфатизомеразы 497
 β -Трипсин, трехмерная структура 74

Уравнение Слэтера-Кирквуда 114

Фактор энтропийный 95, 96
 Ферредоксин 515
 Ферроцитохром с 181, 182, 184
 Фиброин шелка 67–69
 Фосфофруктокиназа 513

Химотрипсин
 - лауэграмма 70
 - α - 508, 509
 - - трехмерная структура 74, 181, 184
 Химотрипсиноген, трехмерная структура 74, 506
 Хроматин 53

Цистинсодержащие пептиды, конформационный анализ 283
 Цитохром с 515

Шапероны 77, 99
 Шейл(ы) пептидного скелета 224
 - БПП₅ 258, 259

Эластаза, трехмерная структура 74
 Эндорфины 338–340, 353–362
 - α - 338, 339, 353–360
 - β - 338, 339, 359–362
 - γ - 338, 339, 356–359
 - δ - 338, 339, 356–359
 Энкефалины 244, 338–353
 - Leu- 338, 340–342, 344, 345, 351–353, 392, 393
 - - рентгеноструктурный анализ 344–346
 - Met- 245, 338–355, 386, 389, 392, 393
 - - конформационный анализ 340–353
 - - рентгеноструктурный анализ 344–346
 Энинатин В 285
 Эрабутоксинны 414, 422, 423, 589

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	5
ОТ АВТОРА	6
ВВЕДЕНИЕ	9
Бносфера научное мышление и проблема белка	
Литература	57

Часть I

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКА

Г л а в а 1	ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ЗАДАЧИ ПРОБЛЕМЫ БЕЛКА	59
1 1	Химическое строение белка	59
1 2	Пространственное строение белка	67
1 3	Структурная организация белка	75
Г л а в а 2	ТЕОРИИ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКА	88
2 1	Бифуркационная теория свертывания белковой цепи	90
2 2	Физическая теория структурной организации белка	100
Г л а в а 3	ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД К КОНФОРМАЦИОННОМУ АНАЛИЗУ	110
3 1	Механическая модель	112
3 2	Потенциальные функции невалентных взаимодействий атомов	113
	Литература	126

Часть II

ПРОСТЕЙШИЕ ПЕПТИДЫ

Г л а в а 4	СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПЕПТИДНОЙ ГРУППЫ	129
4 1	Конфигурация пептидной группы	131
4 2	Колебательные спектры амидов	140
4 3	Электронная структура пептидной группы	145
Г л а в а 5	КОНФОРМАЦИИ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ	154
5 1	Метиламиды N ацетил α аминокислот	157
5 2	N Метилные производные метиламидов N ацетил α аминокислот	167
5 3	Боковые цепи аминокислотных остатков	173
5 4	Аминокислотные остатки в свободном состоянии и белках	181

Глава 6. КОНФОРМАЦИИ МЕТИЛАМИДОВ N-АЦЕТИЛДИ- И ТРИПЕПТИДОВ	190
6.1. Метиламиды N-ацетилдипептидов	194
6.2. Метиламиды N-ацетилтрипептидов	197
Глава 7. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД КОНФОРМАЦИОННОГО АНАЛИЗА ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ	219
7.1. Классификация пространственных структур пептидов и белков	221
7.2. Алгоритм программы расчета конформаций	233
7.3. Проблема множественности минимумов потенциальной поверхности пептидов и белков	239
Литература	250

Часть III ОЛИГОПЕПТИДЫ

Глава 8. ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА БРАДИКИНИНПОТЕНЦИРУЮЩИХ ПЕПТИДОВ	256
Глава 9. КОНФОРМАЦИОННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ МОЛЕКУЛЫ АНГИОТЕНЗИНА II	269
Глава 10. СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЦИСТИНСОДЕРЖАЩИХ ПЕПТИДОВ	283
10.1. Экспериментальные и теоретические подходы к конформационному анализу пептидов	283
10.2. Апамин	292
10.3. Тертиапин	305
10.4. МСД-пептид	312
10.5. Инсектотоксин I ₁	317
10.6. Нейрогипофизарные нонапептидные гормоны	325
Глава 11. ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ ЛИГАНДОВ ОПИАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ	335
11.1. Энкефалины	340
11.2. Эндорфины	353
Глава 12. ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ МЕЛАНОТРОПИНОВ	362
Глава 13. ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ СЕКРЕТИНА	371
Глава 14. ПРИНЦИПЫ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПРИРОДНЫХ ОЛИГОПЕПТИДОВ	384
Литература	406

Часть IV БЕЛКИ

Глава 15. АПРИОРНЫЙ РАСЧЕТ ТРЕХМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ N-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА (1-23) НЕЙРОТОКСИНА II	414
Глава 16. АПРИОРНЫЙ РАСЧЕТ ТРЕХМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ МОЛЕКУЛЫ ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО ТРИПСИНОВОГО ИНГИБИТОРА	426
16.1. Результаты расчета	428
16.2. Теория, эксперимент, выводы	460

16 3 Механизм структурной самоорганизации	471
Г л а в а 17 СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ПРОБЛЕМЕ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКА	482
17 1 Теоретические модели	484
17 2 Эмпирические модели	500
17 3 Экспериментальные модели	520
Г л а в а 18 ГИПОТЕЗА О СТЕРЕОХИМИЧЕСКОМ ГЕНЕТИЧЕСКОМ КОДЕ	527
Г л а в а 19 ОБРАТНАЯ СТРУКТУРНАЯ ЗАДАЧА ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ	543
19 1 Теоретические основы	548
19 2 Аналоги брадикининипотеицирующего пентапептида	555
19 3 Пептиды δ сна и его аналоги	560
19 4 Аналоги ангиотензина II	567
Литература	579
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	587
ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ	594
ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ	594

Научное издание

Попов Евгений Митрофанович

ПРОБЛЕМА БЕЛКА

Том 3

**СТРУКТУРНАЯ
ОРГАНИЗАЦИЯ БЕЛКА**

Утверждено к печати

Ученым советом

Института биоорганической химии
им М М Шемякина и Ю А Овчинникова
Российской академии наук

Заведующая редакцией

"Наука – биология, химия"

Е В Тихомирова

Редактор *Т И Белова*

Художественный редактор *В Ю Яковлев*

Технический редактор *Т А Резникова*

Корректоры *А В Васильев Ю Л Косорыгин,
Р В Молоканова, В С Ракитина Н И Харламова*

Набор и верстка выполнены в издательстве
на компьютерной технике

ЛР № 020297 от 23.06.1997

Подписано к печати 10.09.97

Формат 60 × 90¹/₁₆, Гарнитура Таймс

Печать офсетная

Усл.печ.л. 38,0. Усл.кр.-отт. 38,0. Уч.-изд.л. 48,0

Тираж 600 экз. Тип. зак. № 3315

Издательство "Наука"

117864 ГСП-7, Москва В-485, Профсоюзная ул., 90

Санкт-Петербургская типография "Наука"

199034, Санкт-Петербург В-34, 9-я линия, 12